

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
MARINE MALBEC

IMPLICATION DE MDM2 DANS LA RESTRICTION DES RÉTROVIRUS PAR
TRIM5 α SELON UN MÉCANISME DÉPENDANT DU PROTÉASOME

JANVIER 2011

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Docteur Lionel Berthoux, directeur du laboratoire de rétrovirologie à l'Université du Québec à Trois-Rivières pour m'avoir acceptée dans son équipe de recherche. Son enthousiasme, sa disponibilité et ses conseils ont soutenu et encouragé mes travaux.

Je remercie également :

- Mélodie B. Plourde, assistante de recherche, pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son amitié qui m'ont soutenue tout au long de ces deux années. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble.

- Pham Quang Toan, étudiant à la maîtrise, pour son aide sur ce projet et sa bonne humeur.

- Alexandra Létourneau-Hogan, stagiaire au laboratoire à l'été 2009 pour son aide sur ce projet.

- les membres présents et passés du laboratoire ainsi que les stagiaires : Julie B., Amélie B., Marie Edith N., Aida, Caroline, Lolita et les deux Maxime.

- les membres des autres laboratoires : Sophie, Céline, Valérie, Julie, Alexandre, Julie C. et Marilyne.

Je n'oublie pas les Docteurs Éric Asselin et Carlos Reyes-Moreno qui ont accepté de partager leur matériel, le Docteur Jérémy Luban pour le don du plasmide pAPM et Éric Massicotte de l'Institut de Recherche Clinique de Montréal pour avoir effectué le tri des cellules TE671.

Je remercie le Docteur Claude Gicquaud, ancien élève de l'INSA et professeur de l'Université du Québec à Trois-Rivières, qui m'a recommandé cette équipe de recherche.

Un très grand merci à mes amis québécois Mélodie, Jérôme, Julie, Francis, Kelly, Line et Myriam sans lesquels cette aventure québécoise n'aurait pas été la même.

Enfin, merci à ma famille qui m'a toujours encouragée et soutenue malgré la distance qui nous séparait.

RÉSUMÉ

TRIM5 α est un facteur de restriction, c'est-à-dire une protéine de l'hôte qui inhibe l'infection virale. TRIM5 α , suite à une interaction avec la capsid virale, inhibe la réplication rétrovirale lors des phases précoces de l'infection soit avant l'intégration. TRIM5 α agit selon trois mécanismes : il accélère la décapsidation des virus soumis à restriction, inhibe la synthèse de l'ADN viral via un mécanisme impliquant le protéasome et prévient le transport du complexe de réplication vers le noyau.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de TRIM5 α et d'identifier des partenaires protéiques impliqués dans son activité de restriction, un crible génétique par perte de fonction basé sur l'interférence à l'ARN a été mis en place. Ainsi, des cellules humaines TE671 ont été transduites avec une banque de 200 000 shRNA ciblant 47 400 gènes humains. TRIM5 α endogène humain possède dans ces cellules une forte activité de restriction spécifiquement dirigée contre le virus de la leucémie murine (MLV) N-tropique mais pas contre la souche B-tropique. Après deux tours de sélection différentielle, les clones présentant une permissivité plus élevée pour N-MLV furent retenus. L'un d'eux exprime un shRNA ciblant l'oncoprotéine MDM2 (Murine Double Minute-2). MDM2 est une ubiquitine ligase, tout comme TRIM5 α , et est bien connue pour son rôle de régulateur du gène suppresseur de tumeur p53. L'expression du shRNA contre MDM2 entraîne dans les TE671 une augmentation de l'infection par N-MLV et EIAV (virus de l'anémie infectieuse équine) de 2 à 5 fois. De plus, le knockdown de MDM2 augmente la quantité des produits de reverse transcription de N-MLV selon un mécanisme dépendant du protéasome comme ce qui est obtenu avec TRIM5 α . Le trioxide d'arsenic (As₂O₃) est un inhibiteur de TRIM5 α dont le mécanisme d'action est toujours inconnu. Nous avons montré que l'effet de l'As₂O₃ sur l'infectivité du N-MLV était moins important dans des cellules MDM2 knockdown. Enfin, le shRNA contre MDM2 n'a aucun effet sur l'infectivité de N-MLV lorsque les cellules expriment également un shRNA contre TRIM5 α . Des données similaires ont été obtenues avec le

VIH-1 dans des cellules Vero de Macaque. Toutes ces données suggèrent l'implication de MDM2 dans la restriction de N-MLV, ELAV et du VIH-1 par TRIM5 α .

Mots clés : TRIM5 α , MDM2, facteur de restriction, rétrovirus, MLV, ARNi, VIH-1

TABLE DES MATIÈRES

[illegible]

1.4	MDM2, une oncoprotéine connue principalement pour son rôle de régulateur de p53.....	16
1.4.1	MDM2 régule l'expression et l'activité du gène suppresseur de tumeur p53	16
1.4.2	Structure de MDM2	18
1.4.3	Les Nutlins : de petites molécules inhibitrices de la liaison entre MDM2 et p53.....	18
1.4.4	MDM2 interagit avec 2 membres de la famille TRIM : PML et Kap1	20
1.4.5	MDM2 est une ubiquitine ligase de Vif.....	21
1.5	L'interférence à ARN	22
1.5.1	Historique de l'interférence à l'ARN.....	22
1.5.1.1	Un phénomène découvert grâce à des pétunias....	22
1.5.1.2	Puis observé chez C.elegans.....	23
1.5.1.3	Enfin expliqué en 1998.....	23
1.5.1.4	Et contre toute attente découvert chez les mammifères.....	23
1.5.1.5	L'ARNi une découverte qui mérite un prix Nobel.....	24
1.5.2	Mécanisme de l'interférence à l'ARN	24

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES27

2.1	Lignées cellulaires utilisées	27
2.2	Plasmides utilisés.....	27
2.3	Production des virus utilisés par cotransfection de trois plasmides	29
2.4	Transduction de cellules	31
2.5	Agents chimiques.....	31
2.6	Infection et tri des cellules GFP positives	31
2.7	Amplification par PCR des shRNA exprimés dans les clones d'intérêt.....	32
2.8	Clonage des shRNA amplifiés par PCR dans le vecteur pSIH1H1.....	32
2.9	Séquençage des shRNA exprimés dans les clones d'intérêts et identification de la cible du shRNA	33
2.10	Suivi de la synthèse de l'ADN de MLV	33
2.11	Immunobuvardage de type Western	34

CHAPITRE 3	
CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE	35
 CHAPITRE 4	
RÉSULTATS	37
4.1 Crible génétique par perte de fonction pour identifier des partenaires cellulaires de TRIM5 α	37
4.2 Identification des cibles des shRNA exprimés dans les lignées clonales d'intérêt	40
4.3 Vérification du phénotype de restriction causé par chaque shRNA isolé	42
4.4 Validation du knockdown de MDM2	43
4.5 L'effet antiviral de MDM2 dépend de l'activité de restriction de TRIM5 α	46
4.6 Le knockdown de MDM2 diminue la sensibilité de N-MLV au trioxyde d'arsenic As ₂ O ₃	48
4.7 MDM2 agit sur l'accumulation de l'ADN complémentaire de N-MLV selon un mécanisme impliquant le protéasome	49
4.8 Déterminer les domaines de MDM2 important pour la restriction	51
 CHAPITRE 5	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	53
5.1 Raisons de la non exhaustivité du crible et shRNAs susceptibles d'être isolés	53
5.2 La famille TRIM, une famille aux propriétés antirétrovirales?	55
5.3 Vers le mécanisme de MDM2 dans la restriction de N-MLV	57
5.4 Conclusion et perspectives	59
 BIBLIOGRAPHIE	61
 ANNEXES	73

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure des rétrovirus.....	1
1.2 Structure génétique commune à l'ensemble des rétrovirus.....	3
1.3 Mode d'infection et cycle de réplication des rétrovirus [4].....	4
1.4 Mécanisme de restriction d'APOBEC3G contre le VIH et inhibition par Vif [16]	7
1.5 Mécanisme d'action de la Tetherin [23]	8
1.6 Structure de la protéine TRIM5 α	9
1.7 Auto-ubiquitination et ubiquitination croisée entre Ro52 et TRIM5 α [28].....	10
1.8 Différences entre TRIM5 α et TRIMCyp [39]	11
1.9 Mécanisme d'action de TRIM5 α	14
1.10 Boucle de rétroaction des régulations de MDM2 et p53 [67]	17
1.11 Structure de MDM2 et domaines de liaisons pour différentes protéines.....	18
1.12 Structure de Nutlin3 [66]	19
1.13 Mécanisme d'action des Nutlin [67]	19
1.14 Domaines d'interaction entre MDM2 et KAP1 [74].....	20
1.15 Domaines d'interaction entre MDM2 et PML [76]	21
1.16 Phénotype de la plante sauvage et des plantes transgéniques obtenues après introduction du gène CHS responsable de la pigmentation [78].....	22
1.17 Mécanisme de l'ARN interférence.....	26
4.1 Niveau de restriction de N-MLV dans les différentes lignées clonales.....	38
4.2 Démarche expérimentale	39
4.3 Titration de N-MLV et B-MLV.....	42
4.4 Résultat de l'analyse blast du shRNA exprimé dans le clone 47	43
4.5 Le knockdown de MDM2 diminue la restriction du N-MLV	45

4.6	MDM2 est impliqué dans l'activité de restriction de TRIM5 α	47
4.7	Le knockdown de MDM2 diminue la sensibilité de N-MLV à l'arsenic.....	48
4.8	MDM2 diminue l'accumulation de l'ADN viral selon un mécanisme impliquant le protéasome.....	50
4.9	Mutants de MDM2	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Spécificité de restrictions rétrovirales des variants interespèces de TRIM5 [30] ..	12
2.1 Plasmides utilisés pour la production des vecteurs rétroviraux	30
4.1 Nombre de shRNA différents obtenus suite au clonage du shRNA exprimé dans chaque clone de départ	40
4.2 Cibles potentielles des shRNA isolés	41

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	Acide désoxyribonucléique double brin
ARN	Acide ribonucléique
ARN dB	Acide ribonucléique double brin
As ₂ O ₃	Trioxide d'arsenic
ATP	Adénosine triphosphate
B/N	Ratio entre le pourcentage de cellules infectées par MLV-B et N
CA	Capside
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMSO	DiMethyl Sulfoxide
ELAV	Virus de l'anémie équine
GFP	Green fluorescent protéine (protéine fluorescente verte)
GRBCM	Groupe de recherche en biopathologies cellulaires et moléculaires
VIH	Virus de l'immunodeficiency humaine
VIH-shRNA	Virus de l'immunodeficiency humaine exprimant un shRNA
IN	Intégrase
IRCM	Institut de Recherche clinique de Montréal
KD	Knockdown
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Protéines de la matrice
B-MLV	Virus de la leucémie murine B tropique ()
B-MLVGFP	Virus de la leucémie murine B tropique exprimant GFP
B-MLVRFP	Virus de la leucémie murine B tropique exprimant RFP
N-MLV	Virus de la leucémie murine N tropique
N-MLVGFP	Virus de la leucémie murine N tropique exprimant GFP
N-MLVRFP	Virus de la leucémie murine N tropique exprimant RFP
MDM2	Murine Double Minute 2
MDM2kd	MDM2 knockdown

NC	Nucléocapside
PBS	Phosphate buffered saline (Tampon phosphate salin)
PCR	Polymerase chain reaction (Réaction en chaine par polymérase)
PEI	Poly Ethylène Imine
PIC	Complexe de préintégration
PR	Protéase
P/S	Pénicilline/Streptomycine
RFP	Red fluorescent protein (Protéine fluorescente rouge)
RSV	Virus du sarcome de Rous
RT	Reverse transcriptase (Transcriptase inverse)
RTC	Reverse Transcriptase complex
ShRNA	Short hairpin Ribonucleic acid
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
siRNA	Small interference ribonucleic acid
SIVmac	Virus de l'immunodéficience simienne
SU	Protéine de surface
SVF	Sérum de veau fœtal
TRIM	Tripartite Motif Protein (Protéine à Motif Tripartite)
TRIM5 α AGM	TRIM5 α du singe vert
TRIM5 α hu	TRIM5 α humain
TRIM5 α Rh	TRIM5 α du macaque rhésus
UV	Ultra violet
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Les rétrovirus

Découverts depuis un siècle, les rétrovirus se distinguent par leur mode de réplication. Leur génome composé de deux brins d'ARN monocaténaire est transcrit en ADN bicaténaire grâce à une enzyme virale la transcriptase inverse (RT) puis intégré de façon définitive, sous forme de provirus, au génome de la cellule hôte [1, 2].

1.1.1 Structure et génome des rétrovirus

1.1.1.1 Structure de la particule virale

Les rétrovirus sont des particules sphériques et enveloppées de 80 à 100 nm de diamètre. Ils sont constitués d'une enveloppe membranaire phospholipidique qui exprime à sa surface des protéines virales transmembranaire (TM) et de surface (SU). L'intérieur de l'enveloppe est tapissée d'une matrice protéique (MA). Vient ensuite une capside virale protéique (CA) à l'intérieur de laquelle se trouve : l'ARN viral entouré par les protéines de nucléocapside (NC) et les enzymes virales reverse transcriptase (RT), intégrase (IN) et protéase (PR) [3].

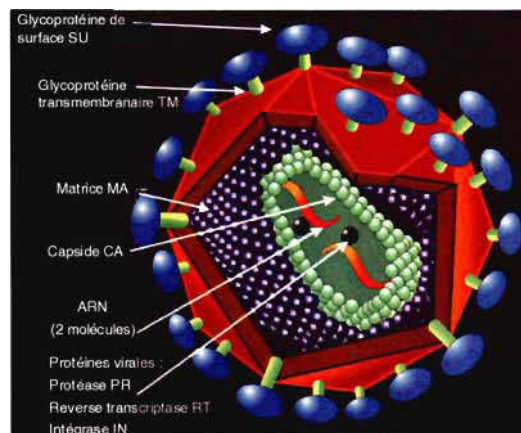


Figure 1.1 : Structure des rétrovirus

1.1.1.2 Le génome viral

Le génome des rétrovirus est constitué de deux copies identiques d'ARN simple brin de polarité positive. Trois gènes principaux codent des polyprotéines. Le gène *gag* (pour group-specific antigen), le gène *pro-pol* (pour polymérase) et le gène *env* (pour enveloppe glycoprotéine) codent pour des protéines de structure et des enzymes. À l'extrémité du génome se trouvent les séquences terminales non codantes, les LTRs (Long Terminal Repeat) renfermant le promoteur (LTR 5') et le site de polyadénylation (LTR 3') (Fig. 1.2).

Le gène *gag* code pour un polyprécurseur Gag dont le clivage enzymatique par la protéase virale PR durant l'assemblage permet la formation de trois protéines de structure : la capside (CA), la matrice (MA) et la nucléocapside (NC).

Le gène *pro-pol* code pour un précurseur Gag-Pro-Pol. Son clivage par la protéase virale libère trois enzymes virales : la protéase [3], responsable du clivage des précurseurs des protéines virales; la reverse transcriptase (RT) qui permet la reverse transcription de l'ARN viral en ADN et l'intégrase (IN), essentielle à l'intégration de l'ADN viral au sein du génome de la cellule hôte.

Les protéines d'enveloppe sont issues du clivage d'un précurseur codé par le gène *Env*. Ce précurseur Env est clivé par une protéase cellulaire durant sa migration vers la membrane plasmique pour générer la glycoprotéine de surface (SU) et la glycoprotéine transmembranaire (TM).

Ces trois gènes sont présents chez l'ensemble des rétrovirus et essentiels à leur réplication. Néanmoins certains rétrovirus, dits complexes (exemple les lentivirus) possèdent des gènes supplémentaires codant pour des protéines régulatrices et accessoires comme les protéines Rev (Regulator of virion gene expression), Tat (Transactivator of transcription), Vpu (Viral protein u) ou Nef (Negative factor) du VIH-1 qui si elles ne sont pas toutes indispensables à la réplication du virus *in vitro* le sont *in vivo*. Ces protéines ont donc été appelées accessoires [2].

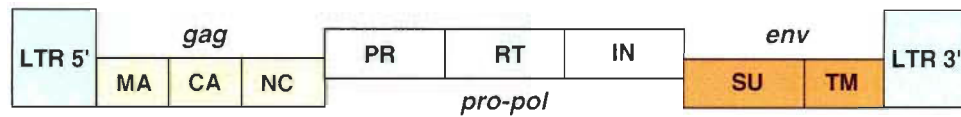


Figure 1.2 : Structure génétique commune à l'ensemble des rétrovirus

1.1.2 Le cycle viral

Le cycle viral peut être divisé en deux phases :

- une phase précoce allant de la fixation du virus au niveau de la membrane cellulaire jusqu'à l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire;
- une phase tardive allant de l'expression du provirus jusqu'à la libération de nouvelles particules virales.

L'interaction de la protéine d'enveloppe SU avec un récepteur membranaire spécifique de la cellule hôte provoque la fusion des membranes virale et cellulaire libérant ainsi la capside virale dans le cytoplasme où elle est déshabillée pour former les complexes de reverse transcription.

L'étape de reverse transcription est réalisée au sein d'un complexe multi-protéique RTC (*Reverse Transcription Complex*). Elle permet la synthèse d'une molécule d'ADN double brin à partir de la matrice d'ARN et fait intervenir la transcriptase inverse.

L'ADN ainsi formé migre dans le noyau où il est intégré au génome de la cellule hôte grâce à l'action de l'intégrase.

L'ADN proviral intégré est ensuite transcrit en utilisant la machinerie cellulaire de la cellule infectée. Le LTR en 5' se comporte comme un promoteur alors que le LTR en 3' joue le rôle de site de poly-adénylation et de site de terminaison. Le LTR possède des sites de liaison pour plusieurs facteurs cellulaires activateurs permettant l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II. Les transcrits viraux, épissés ou non,

migrent dans le cytoplasme pour être traduits en protéines structurales et enzymatiques qui sont assemblées autour de deux molécules d'ARN pour permettre la formation de nouvelles protéines virales.

Les protéines Gag rejoignent la membrane plasmique pour initier l'assemblage et le bourgeonnement des virions. Une fois les particules libérées, la protéase PR clive les précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol, permettant ainsi la maturation des virions en particules infectieuses (Fig. 1.3) [2].

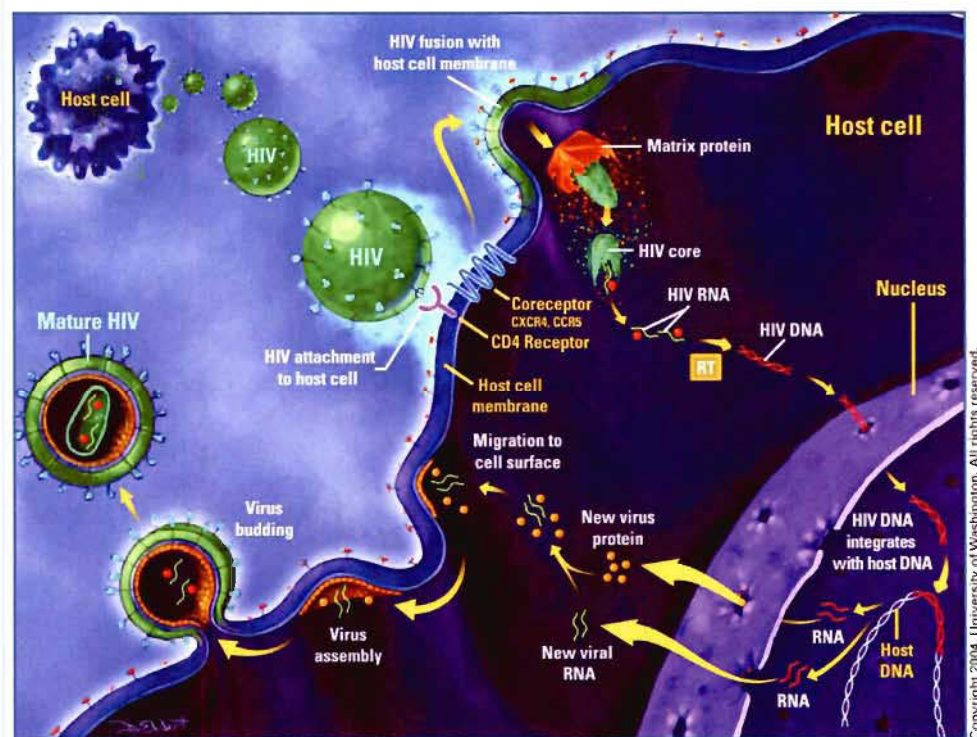


Figure 1.3 : Mode d'infection et cycle de réplication des rétrovirus [4]

1.2 Les facteurs de restriction

Les mammifères sont soumis aux infections rétrovirales depuis des millions d'années au cours desquelles ils ont développé des mécanismes visant à limiter ces infections, comme les immunités adaptative et innée. Parmi les différents acteurs de l'immunité innée ont été découvertes des protéines aux propriétés anti-rétrovirales

nommées "facteurs de restriction". Ils comprennent trois principales familles qui ont récemment été identifiées : les cytidines déaminases de type Apobec, les membres de la famille TRIM et enfin Tetherin.

1.2.1 Fv1, prototype des facteurs de restriction

Le premier facteur de restriction, Fv1 (Friend Virus Susceptibility) a été découvert chez la souris à la fin des années 60 [5]. Le croisement de souris NIH-3T3 avec les souris Balb c a permis de mettre en évidence une activité de restriction à caractère héréditaire contre la souche Friend du MLV (Murine leukemia virus). Le gène Fv1 qui code pour cette activité possède 2 allèles codominants, *Fv1^b* et *Fv1ⁿ* qui déterminent la susceptibilité des souris aux différentes souches de MLV. Ainsi, les souris exprimant *Fv1ⁿ* sont résistantes au MLV de tropisme B alors que celles exprimant *Fv1^b* bloquent le MLV N tropique. La cible de la restriction Fv1 est la capsid [6]. Deux acides aminés de cette dernière (aa 109 et 110) contrôlent la susceptibilité à la restriction, un seul de ces acides aminés (aa 110) étant suffisant pour la conversion d'un virus N en B-tropique [7, 8]. Fv1 bloque la réplication virale lors de la migration du complexe de réplication vers le noyau.

1.2.2 Restriction rétrovirale chez les primates

Le gène codant pour Fv1 est absent chez les autres mammifères. Les cellules humaines et simiennes présentent néanmoins une activité de restriction face à différents rétrovirus. Ces activités sont dues à des facteurs de restriction dénommés *Restriction Factor 1* (Ref1) chez l'homme et *Lentivirus Susceptibility factor 1* (Lv1) chez le singe [9].

La découverte de la protéine simienne Trim5α qui possède une activité de restriction contre le VIH a permis de démontrer que Ref1, Lv1 et Trim5α ne sont en fait qu'un seul et unique facteur de restriction [10]. Le mécanisme d'action de Trim5α est présenté dans le chapitre 3.

1.2.3 APOBEC3G

Le facteur de restriction APOBEC3G (A3G) a été identifié en 2002 par l'équipe de Michael Malim [11]. Il appartient à la famille des cytidines déaminases, connues pour leur fonction dans l'édition de l'ARN et de l'ADN. Lors de l'étape de reverse transcription, A3G provoque une hypermutation du matériel génétique viral. La protéine du VIH, Vif neutralise cette ligne de défense antivirale en provoquant la dégradation d'APOBEC3G, permettant ainsi la propagation du virus.

La protéine Vif est présente dans presque tous les lentivirus et est indispensable à une multiplication virale efficace *in vivo*. En culture cellulaire, on distingue deux types de cellules : les cellules dites restrictives (lymphocytes et macrophages primaires...) dans lesquelles le virus VIH dépourvu du gène vif (VIHΔVif) est incapable de se répliquer, et les cellules dites permissives (par exemple certaines lignées lymphocytaires tumorales) dans lesquelles le virus VIHΔvif se réplique normalement. Les virions produits en l'absence de Vif dans une cellule restrictive semblent physiquement normaux mais ne sont pas infectieux. Les cellules restrictives expriment un facteur antiviral, A3G, qui est inhibé par Vif. Dans les cellules permissives, Vif n'est pas nécessaire, car A3G est absent.

La protéine APOBEC3G (A3G) est incorporée dans les virions en absence de Vif et agit lors de l'infection d'une nouvelle cellule cible. A3G, associée au complexe de transcription inverse, réalise l'édition de résidus C vers U sur le brin négatif de l'ADN viral naissant. Cette édition entraîne l'incorporation erronée d'adénine sur le brin positif d'ADN et donc l'accumulation d'hypermutations G vers A dans le provirus, ainsi rendu défectif [12]. 1 à 2 % de tous les résidus G présents dans l'ADN viral sont transformés en A. Le matériel viral hypermuté peut ensuite subir deux destinées. Il peut être reconnu par les enzymes cellulaires d'excision-réparation de l'ADN et être dégradé, avant même l'intégration dans le génome de la cellule (Fig. 1.4). Si le provirus échappe à la dégradation et s'intègre à l'ADN de la cellule hôte, les protéines virales ne seront pas fonctionnelles à cause du taux de mutation trop élevé et le cycle viral s'arrêtera donc.

La protéine virale Vif contrecarre A3G en limitant son incorporation dans les particules virales [13, 14]. Vif interagit avec A3G et recrute un complexe E3 ubiquitine ligase provoquant leur polyubiquitination et leur dégradation par le protéasome [15].

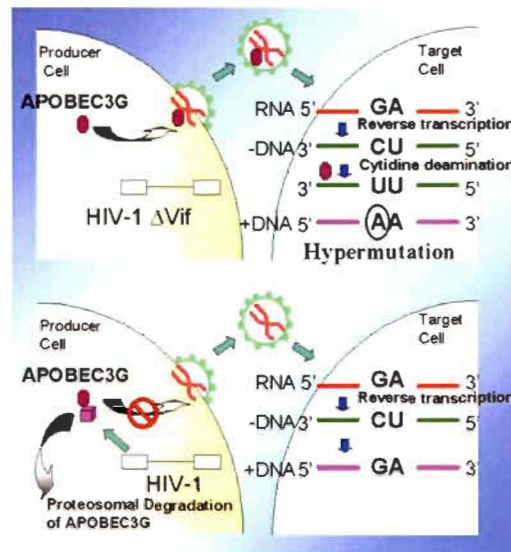


Figure 1.4 : Mécanisme de restriction d'APOBEC3G contre le VIH et inhibition par Vif [16]

1.2.4 Tetherin

En 2008, un nouveau facteur de restriction a été identifié : la Tetherin à la différence des autres facteurs de restrictions qui agissent lors des phases précoces de l'infection, la Tetherin intervient au cours d'une des dernières étapes du cycle viral, lors du bourgeonnement des virions. Elle retient les virions infectieux à la surface de la cellule, empêchant leur relargage. L'action de la Tetherin est en revanche inhibée par une des protéines "accessoires" du VIH : Vpu (Fig. 1.5) [17].

La Tetherin, aussi nommée BST-2/CD317 est une protéine membranaire inducible par les interférons. Elle possède à ses extrémités deux domaines d'ancrage membranaire : en N terminal une queue cytoplasmique qui traverse la membrane et en C terminal un motif glycoposphatidylinositol(GPI) ancré dans la membrane. La Tetherin intégrée à la membrane cellulaire s'associerait au virus au cours de son bourgeonnement.

Les deux extrémités de la protéine insérées dans l'une ou l'autre des membranes cellulaires ou virales forment un lien entre ces deux entités qui restent accrochées l'une à l'autre. La Tetherin peut également être incorporée dans les virions entraînant la formation de chaînes de virus accrochés à la surface de la cellule [18-20].

La protéine accessoire du VIH, Vpu, nécessaire à l'assemblage de nouvelles particules virales, inhibe l'action de la Tetherin. Ainsi, la présence de Vpu provoque une diminution de l'expression de la Tetherin à la surface des cellules infectées permettant ainsi un relargage efficace des virions. Si les deux protéines interagissent physiquement, la façon dont Vpu dégrade la Tetherin est encore mal comprise. Néanmoins une dégradation par la voie lysosomale est avancée par différentes équipes [21, 22].

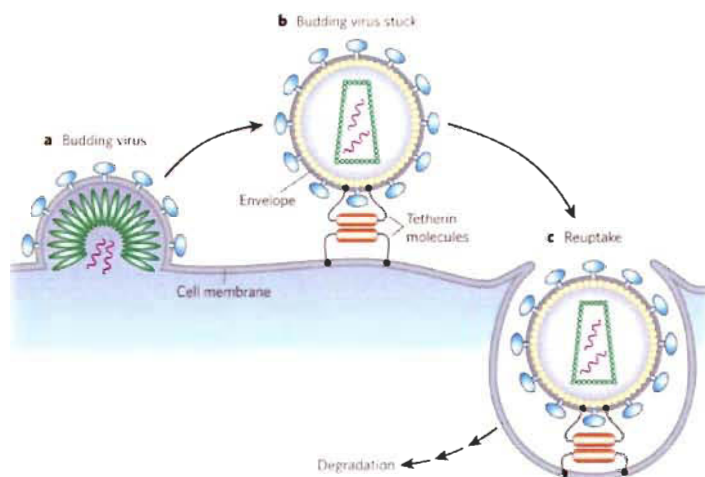


Figure 1.5 : Mécanisme d'action de la Tetherin [23]

1.3 TRIM5 α , une protéine inhibitrice des rétrovirus

1.3.1 Structure de TRIM5 α

Les cellules de primates possèdent une activité de restriction contre les rétrovirus d'autres espèces. Cette restriction est liée à la protéine TRIM5 α , membre de la famille à motif tripartite TRIM (ou RBCC). TRIM5 α est constituée d'un domaine RING en position N-Terminale suivi des domaines B-Box et Coil-Coiled et d'un domaine SPRY.

en position C-Terminale, responsable de la spécificité de la restriction (Fig. 1.6). Ce domaine SPRY (ou B30.2) est retrouvé chez de nombreux membres de la famille TRIM, mais seul l'isomère α de TRIM5 le possède [24].



Figure 1.6 : Structure de la protéine TRIM5 α

Le domaine Coiled-Coil est responsable de l'homo et l'hétéro multimérisation des protéines TRIM. Des mutations au niveau de ce domaine empêchent l'interaction entre les multimères de TRIM5 α et les hexamères de capsid virale et abolissent la restriction par TRIM5 α [25]. D'après la littérature, TRIM5 α formerait des dimères, trimères et hexamères [26, 27].

Le domaine en doigt de zinc RING confère à TRIM5 α une activité ubiquitine ligase *in vitro et in vivo*. Elle lui permet de s'auto-ubiquitiner en présence d'une protéine E2 ubiquitine ligase et d'être ubiquitinée par un autre membre de la famille TRIM: TRIM21, plus communément appelé Ro52. Néanmoins si Ro52 est capable d'ubiquitiner TRIM5 α , l'inverse n'est pas vrai (Fig. 1.7) [28]. Actuellement, aucun autre substrat de l'activité ubiquitine ligase de TRIM5 α autre que la protéine elle-même n'a été identifié. De plus, il a été montré que lorsque l'ubiquitination de TRIM5 α était impossible, en raison de mutations au niveau du domaine RING, l'activité de restriction était altérée.

Le domaine B-Box est nécessaire à l'activité de restriction de trim5 α . Bien que sa fonction soit toujours inconnue, sa similarité de structure avec le domaine RING (doigt de zinc) laisse supposer un rôle dans l'interaction entre protéines et éventuellement une activité ubiquitine ligase [29].

Le domaine SPRY qui interagit avec les hexamères de capsid virale est essentiel à la restriction rétrovirale et détermine la spécificité de la restriction. Il est composé de quatre régions V1, V2, V3 et V4 qui varient en longueur et acides aminés selon les

différentes espèces de primates. La région V1 serait le domaine le plus impliqué dans la spécificité de restriction : ainsi une seule mutation au niveau de l'arginine 332 de la région V1 confère à TRIM5 α_{hu} une activité de restriction contre VIH-1 [30, 31].

Quelles que soient les mutations introduites dans tout autre domaine que SPRY et Coiled-Coil l'interaction entre TRIM5 α et les particules virales n'est pas altérée, cependant l'activité de restriction en est plus ou moins diminuée. Ainsi tous les domaines de TRIM5 α semblent contribuer à l'activité de restriction mais à des niveaux différents [29, 32].

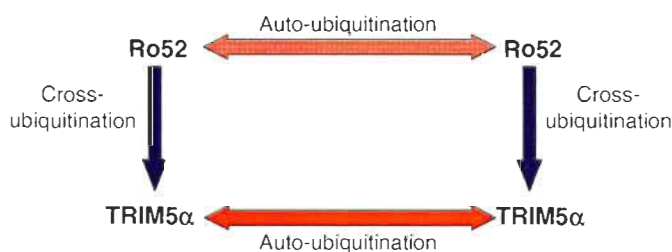


Figure 1.7 : Auto-ubiquitination et ubiquitination croisée entre Ro52 et TRIM5 α [28]

1.3.2 Spécificité de restriction des différents TRIM5

L'activité de restriction de TRIM5 α est spécifique à chaque espèce de primate, mais aucun variant de la protéine ne semble conférer de réelle résistance vis-à-vis de rétrovirus isolés chez la même espèce (Tableau 1.1), évoquant l'implication de ce facteur de restriction comme une barrière potentielle de la transmission interspèce des rétrovirus [30, 33]. Ainsi, les protéines TRIM5 α_{Rh} et TRIM5 α_{hu} possèdent des spécificités de restriction différentes. Alors que les cellules exprimant TRIM5 α_{Rh} sont réfractaires à l'infection par VIH-1 mais permissives à certaines souches du virus de l'immunodéficience simienne (ex : SIV_{mac}), TRIM5 α_{hu} n'inhibe ni le SIV_{mac} ni VIH-1. Ces différences de restriction sont dus au fait que chaque TRIM5 α possède une affinité différente pour chaque rétrovirus.

En effet, TRIM5 α interagit directement avec la capside virale entrante. Ainsi la présence

d'un glutamate en position 110 au niveau de la capside du MLV-B contre une arginine pour MLV-N, permet au MLV-B d'échapper à la restriction par TRIM5 α humain.

Les cellules de singes hiboux et certains macaques du vieux monde expriment une forme singulière de TRIM5 α , appelée TRIMCyp correspondant à une protéine de fusion où le domaine SPRY de TRIM5 α a été remplacé par la cyclophiline A (Fig. 1.8). TRIMCyp à l'instar de TRIM5 α_{Rh} possède une forte activité de restriction contre VIH-1 [34-36].

Il est à noter que l'activité rétrovirale des protéines TRIM5 n'est pas limitée aux primates, puisque les bovins et léporidés expriment tous deux un orthologue de TRIM5 qui les rend réfractaires à l'infection par différents rétrovirus [37, 38].

A. Rhesus macaque TRIM5 α



B. Owl monkey TRIM5CypA

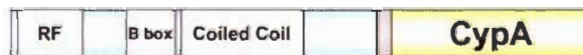


Figure 1.8 : Différences entre TRIM5 α et TRIMCyp [39]

Tableau 1.1**Spécificité de restrictions rétrovirales des variants interespèces de TRIM5 [30]**

Protéines	Espèces	Virus restreints	Virus non restreints	Etape ciblée
TRIM5 α_{hu}	humaine	N-MLV, EIAV, FIV	HIV-1, B-MLV, SIV _{MAC} , SIV _{AGM}	Pré-RT
TRIM5 α_{Rh}	macaque rhésus	HIV-1, FIV	SIV _{MAC}	Pré-RT
TRIM5 α_{AGM}	singe vert	HIV-1, N-MLV, SIV _{MAC} , EIAV	SIV _{AGM}	Pré-RT
TRIMCyp	singe hibou	HIV-1	N-MLV	Pré-RT
TRIM5 α_{SQ}	singe écureuil	SIV _{MAC}	HIV-1	Post-RT
TRIM5	bovine	HIV-1, SIV _{MAC} , N-MLV, FIV	BIV	Pré-RT ou post-RT (selon le virus)
TRIM5	léporidée	HIV-1, EIAV, FIV	SIV _{MAC} , MLV	Pré-RT

1.3.3 Mécanisme antiviral lors des phases précoces

TRIM5 α est une protéine cytoplasmique, exprimée à de faibles niveaux de façon constitutive, et dont l'activité de restriction est saturable à de fortes doses de virus. Ainsi si le nombre de particule virale par cellule est trop important, il n'y aura pas suffisamment de protéine de TRIM5 α pour inhiber la réplication virale qui aura donc lieu normalement. La restriction bloque différentes étapes du cycle de réplication rétrovirale mais intervient majoritairement lors des phases précoces d'infection.

1.3.3.1 Devenir de la capside virale

TRIM5 α reconnaît et interagit avec les protéines de capside virale provoquant le déshabillage accéléré des cores viraux (Fig. 1.9) [40]. Ce mécanisme de restriction entraîne une diminution de la quantité de capsides particulières parfois accompagné d'une augmentation de la quantité de particules solubles [41-46].

1.3.3.2 Rôle du protéasome et de l'ubiquitination dans le mécanisme de restriction

Une récente étude a démontré que la dégradation de TRIM5 α par le protéasome était considérablement accélérée suite à l'infection par un virus soumis à restriction (Fig. 1.9). Ce phénomène n'est pas observé en présence de virus non reconnus par TRIM5 α . L'utilisation de la cyclosporine A, un inhibiteur de la liaison entre TRIMCyp et les capsides virales permet d'abolir la dégradation de ces facteurs de restriction. Ainsi la dégradation accélérée de TRIM5 α ou TRIMCyp par le protéasome nécessite une interaction directe avec la capside d'un virus soumis à restriction [47].

Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome permet de rétablir l'accumulation des produits de reverse transcription sans toutefois abolir la restriction [48, 49].

Toutes ces observations désignent le protéasome comme un important acteur de l'activité de restriction de TRIM5 α mais aucun mécanisme d'action n'a été formellement démontré.

Le fait que la délétion du domaine RING indispensable à l'ubiquitination de TRIM5 α [29] altère la restriction, associé aux observations précédentes suggère qu'un complexe [TRIM5 α ubiquitiné–Capside virale] pourrait être dégradé par le protéasome.

1.3.3.3 TRIM5 altère la migration du complexe de préintégration vers le noyau

Bien que les inhibiteurs du protéasome rétablissent l'accumulation des produits de reverse transcription, ils sont insuffisants pour rétablir l'infection. Ceci suggère l'existence d'une autre voie de restriction indépendante du protéasome qui agirait sur les étapes post-réverse transcription.

Outre l'intégration dans le génome de la cellule hôte et la formation du provirus, l'ADN viral peut former des cercles à 1 LTR ou 2 LTR. Ces deux formes proviennent

respectivement d'un événement de recombinaison homologue ou de la ligation des extrémités de l'ADN viral. Les cercles à 2 LTR sont utilisés comme marqueurs de la localisation des ADN viraux puisqu'ils se forment dans le noyau.

La présence de MG132 (un inhibiteur du protéasome) ne permet pas de restaurer la formation des cercles à 2 LTR alors que les complexes de préintégration (PIC) sont toujours fonctionnels. TRIM5 α serait donc capable d'interférer avec la migration du complexe PIC jusqu'au noyau (Fig. 1.9) [48].

TRIM5 α est localisée dans le cytoplasme majoritairement au sein de corps cytoplasmiques. Le rôle de ces corps a longtemps été négligé car leur déstabilisation par traitement à la geldamycine n'affectait pas l'activité de restriction par TRIM5 α . Cependant, il a récemment été démontré que l'infection par un virus soumis à restriction induisait, malgré la présence de geldamycine, la formation *de novo* de corps cytoplasmiques de TRIM5 autour du complexe de reverse transcription [50, 51]. On émet ainsi l'hypothèse que les corps cytoplasmiques de TRIM5 α pourraient séquestrer les particules virales et ainsi rendre leur accès au noyau impossible.

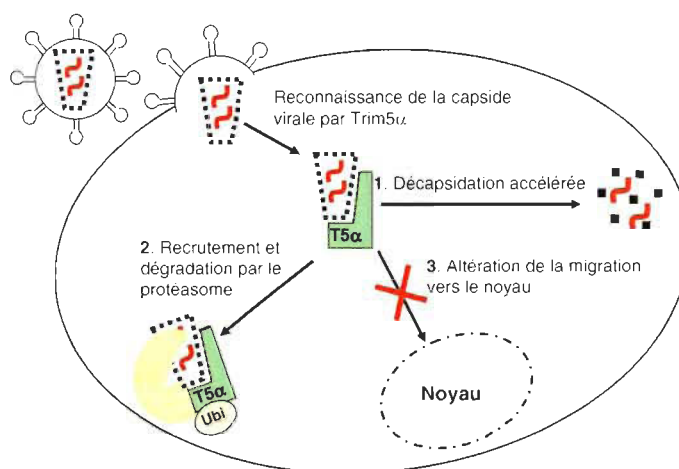


Figure 1.9 : Mécanisme d'action de TRIM5 α . TRIM5 α , suite à une interaction avec la capsid virale, inhibe la réplication rétrovirale lors des phases précoces d'infection. TRIM5 α accélère la décapsidation des virus, leur dégradation par le protéasome et prévient le transport du complexe de réplication vers le noyau.

1.3.4 TRIM5 α est régulé par les interférons

TRIM5 α comme les autres facteurs de restriction Apobec3G et Tetherin est régulé par les interférons. Ainsi les interférons de type 1 (Interférons α et β) mais non de type 2 (interféron γ) activent la transcription de TRIM5 α . TRIM5 α partage une région amplificatrice « *enhancer* en anglais » avec TRIM22[52], un gène connu pour être régulé par l'interféron [53, 54]. De plus, la séquence consensus de l'élément de réponse stimulé par l'interféron "IFN-stimulated response element" (ISRE) est située à l'intérieur de la région de 40 paires de bases en aval des sites d'initiation de transcription du gène TRIM5 α .

L'activation de la transcription provoque une augmentation de la quantité de TRIM5 α dans la cellule provoquant une augmentation de l'activité de restriction de TRIM5 α contre les virus soumis à restriction. Ainsi le traitement par les interférons renforce la restriction de TRIM5 α_{rh} contre le VIH-1 et de TRIM5 α_{hu} contre le N-MLV mais n'a aucun effet sur le niveau de restriction de B-MLV [55-57].

1.3.5 Le trioxyde d'arsenic, une drogue qui inhibe TRIM5 α

Le trioxyde d'Arsenic, As_2O_3 constitue un traitement extrêmement efficace contre la leucémie aiguë promyélocytaire (APL). Elle est provoquée par une protéine de fusion aberrante entre la protéine PML, et le récepteur alpha de l'acide rétinoïque (RAR α) résultant d'une translocation chromosomale. PML est indispensable à la formation des corps PML qui font partie des corps nucléaires. L'arsenic cible la protéine PML entraînant sa sumoylation, son recrutement au niveau des corps nucléaires PML puis sa dégradation [3, 58].

Le traitement au trioxyde d'arsenic stimule également la réplication rétrovirale en inhibant l'activité de TRIM5 α selon un mécanisme encore inconnu. L'arsenic agit sur différents orthologues de TRIM5 α et favorise donc la réplication de différents rétrovirus comme le N-MLV [59, 60].

1.3.6 La cyclophiline A, un cofacteur de TRIM5 α dans la restriction de certains virus

La cyclophiline A est une peptidyl-propyl isomérase cis/trans qui interagit avec la capsid du VIH-1 et catalyse la trans-isomérisation de la proline 90 [61, 62]. Cette interaction peut être inhibée par l'utilisation d'un inhibiteur compétitif : la cyclosporine A [63] ou bien par l'introduction de mutations au niveau de la capsid virale (par exemple : G89V) [61].

La cyclosporine possède des effets opposés sur la réplication du VIH dans les cellules simiennes et humaines.

Dans les cellules simiennes, la cyclophiline A inhibe la réplication du VIH en favorisant l'activité de restriction de TRIM5 α . Au contraire, dans les cellules humaines, la cyclophiline A favorise la réplication du VIH, en protégeant le virus contre un facteur de restriction inconnu, autre que TRIM5 α [64, 65]. Enfin, comme cela a déjà été dit, chez les singes hiboux la cyclophiline A remplace le domaine SPRY de la protéine TRIM5 α pour former la protéine fusion TRIMCyp qui inhibe de nombreux rétrovirus (cf. Tableau 1) [35].

1.4 MDM2, une oncoprotéine connue principalement pour son rôle de régulateur de p53

1.4.1 MDM2 régule l'expression et l'activité du gène suppresseur de tumeur p53

Le facteur de transcription p53, codé par un gène suppresseur de tumeur, est une protéine anti-proliférative et pro-apoptotique. L'accumulation de p53 dans la cellule peut induire l'arrêt de cycle cellulaire en phase G1 ou G2 et/ou l'apoptose, imposant une régulation stricte du niveau de p53 dans les cellules en l'absence de stress.

La protéine MDM2 joue un rôle majeur dans la régulation de p53. En effet, en l'absence de stress, ces deux protéines régulent mutuellement leur niveau d'expression selon une boucle de rétroaction [66, 67].

La transcription de MDM2 est activée par de fortes concentrations de p53 puisque le promoteur de MDM2 contient un élément de réponse à cette protéine. En retour MDM2 se lie à p53, inhibant son activité de transcription et par conséquent sa propre expression (Fig. 1.10).

MDM2 peut réguler l'activité de p53 selon trois voies :

- Inhibition de la transcription,
- Export de p53 hors de noyau vers le cytoplasme,
- Activation de la dégradation de p53 par le protéasome grâce à son activité ubiquitine ligase.

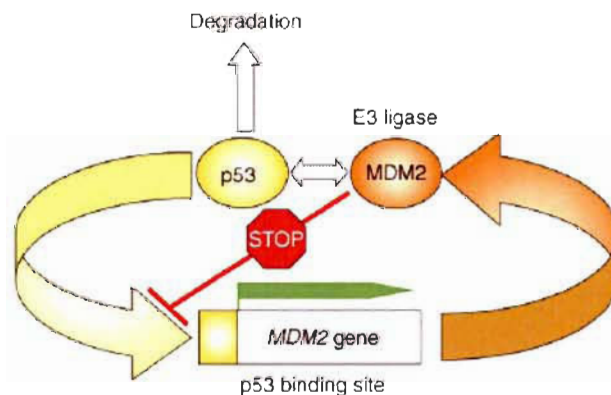


Figure 1.10 : Boucle de rétroaction des régulations de MDM2 et p53 [67]. Des niveaux élevés de p53 activent la transcription de MDM2 qui en retour interagit avec p53 pour réguler son activité en inhibant sa transcription et stimulant sa dégradation par le protéasome.

1.4.2 Structure de MDM2

Excepté les isoformes mineurs, MDM2 est une protéine de 90 kDA composée de 5 régions conservées phylogénétiquement [66, 67] :

- un domaine amino-terminal essentiel pour la liaison de p53 et de nombreuses autres protéines (Fig. 1.8);
- un domaine contenant un site de localisation nucléaire (SLN);
- une région acide constituée essentiellement d'acide glutamique et d'acide aspartique (caractéristique de certains facteurs transactivateurs). Ce domaine est essentiel pour la liaison avec de nombreuses protéines et important pour l'ubiquitination de p53;
- une région en doigt de zinc;
- un domaine Carboxyl-Terminal RING, conférant à MDM2 son activité ubiquitine ligase.

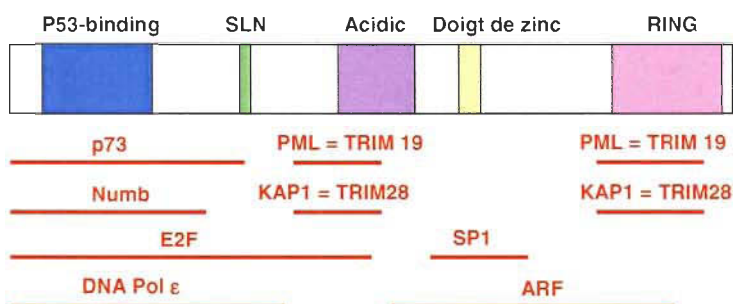


Figure 1.11 : Structure de MDM2 et domaines de liaisons pour différentes protéines

1.4.3 Les Nutlins : de petites molécules inhibitrices de la liaison entre MDM2 et p53

Bien que plus de la moitié des cancers expriment des protéines p53 mutées et défectives, certaines tumeurs et cancers (osteosarcomes, carcinomes, neuroblastome...) sont la conséquence d'une surexpression de MDM2 [68-70].

Ainsi l'activation de la transcription de p53 par l'inhibition de MDM2 a été proposée comme nouvelle stratégie thérapeutique. C'est dans cette optique que de petites molécules nommées Nutlin et dérivées des *cis*-imidazoline ont été synthétisées (Fig. 1.12). Seuls les acides aminés Phe19 Trp23 et Leu26 de p53 sont indispensables à l'interaction entre p53 et MDM2. Les Nutlins miment ces trois acides aminés en se fixant dans une poche hydrophobe présente à la surface de MDM2 ce qui empêche toute interaction avec p53. p53 libérée du contrôle de MDM2 peut s'accumuler et activer les voies de contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. p53 continue à stimuler la transcription de MDM2 qui s'accumule donc dans la cellule mais ne peut interagir avec p53 à cause de la présence de l'inhibiteur nutlin (Fig. 1.13) [66, 67].

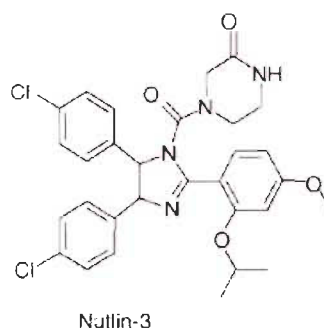


Figure 1.12 : Structure de Nutlin3 [66]

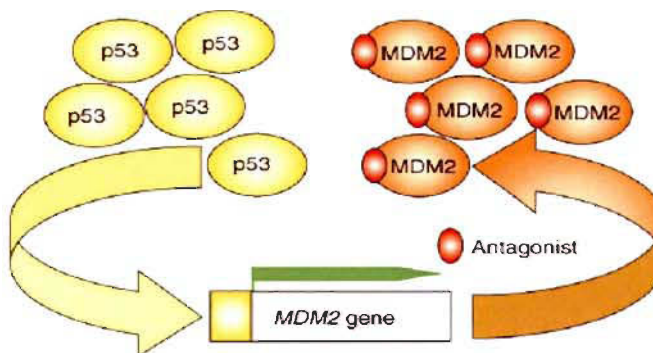


Figure 1.13 : Mécanisme d'action des Nutlin [67]. Les nutlin peuvent se fixer spécifiquement au domaine de liaison de p53 de MDM2, empêchant l'interaction entre les deux protéines. P53 libérée du contrôle MDM2 s'accumule dans la cellule et active la transcription de MDM2. Néanmoins il ne peut se lier à p53 à cause de la présence des nutlin.

1.4.4 MDM2 interagit avec 2 membres de la famille TRIM : PML et Kap1

MDM2 interagit avec deux membres de la famille TRIM, PML (ou TRIM19) et Kap1 (ou TRIM28) qui possèdent donc un motif RBCC, composé à l'extrémité C-terminale d'un domaine RING suivi des domaines B-Box et coiled-coil.

Le corépresseur nucléaire Kap1 avait été initialement identifié comme un corépresseur des protéines KRAB à doigt de zinc (Kruppel-associated box-domain-containing zinc finger proteins) [71]. KAP1 module la transcription des gènes en recrutant divers complexes d'histones déacétylases [72, 73]. Ainsi il coopère avec MDM2 pour inhiber l'acétylation de p53, stimuler son ubiquitination et inhiber sa transcription. L'interaction entre les deux protéines se produit entre le domaine Coiled-Coil de Kap1 et le domaine central acide de MDM2 (Fig. 1.14). De plus, la délétion du domaine RING de Kap1 diminue la coopération entre les deux protéines [74, 75].

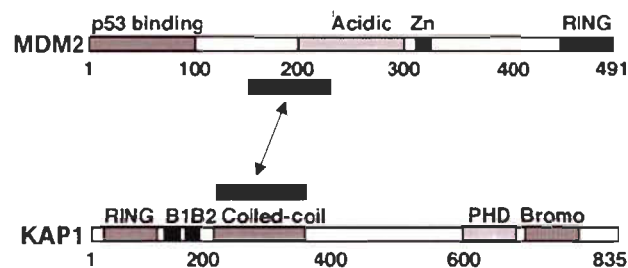


Figure 1.14 : Domaines d'interaction entre MDM2 et KAP1 [74]

La protéine PML est le constituant majoritaire des corps nucléaires de PML. Son action sur p53 est opposée à celle de MDM2. En effet, PML en recrutant p53 à l'intérieur des corps nucléaires stimule son activité.

L'interaction de MDM2 avec PML favoriserait la désorganisation des corps nucléaires et la redistribution de PML dans le cytoplasme. Deux régions de PML peuvent interagir avec MDM2. L'extrémité C terminale de PML se lie à la partie centrale de MDM2 contenant le domaine acide. De plus, les domaines RING et B-Box de PML

peuvent interagir avec l'extrémité C terminale de MDM2, elle-même constituée d'un domaine RING en doigt de zinc (Fig. 1.15). Il semblerait que l'interaction entre les domaines RING des deux protéines soit nécessaire à la redistribution cytoplasmique de PML [76].

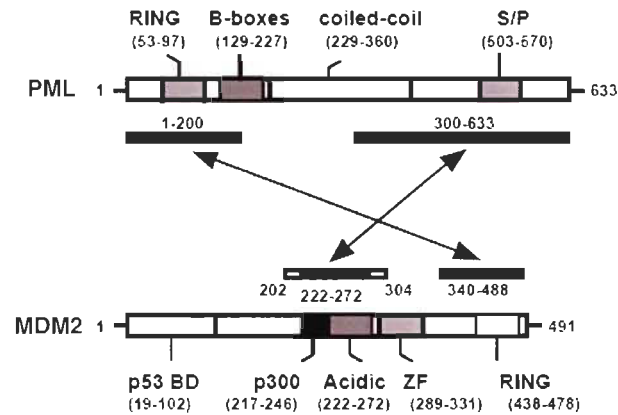


Figure 1.15 : Domaines d'interaction entre MDM2 et PML [76]

1.4.5 MDM2 est une ubiquitine ligase de Vif

En 2009, Izumi et al. [77] furent les premiers à démontrer une activité antivirale de MDM2 contre le VIH-1 et son rôle dans l'ubiquitination de la protéine Vif du VIH. Vif, comme cité en I.II.3 provoque l'ubiquitination et la dégradation du facteur de restriction APOBEC3G qui ne peut donc plus être incorporé dans les virions et provoquer des hypermutations de l'ADN viral lors de l'étape de reverse transcription.

Suite à une interaction physique, MDM2, grâce à son domaine RING qui lui confère son activité E3 ligase provoque la polyubiquitination de Vif puis sa dégradation par le protéasome. Des mutants des deux protéines ont permis de déterminer que la région centrale (acides aminés 168-320), distincte du domaine de liaison à p53, et le domaine en doigt de zinc de MDM2 étaient nécessaires à la liaison des deux protéines.

En présence de MDM2, Vif qui est dégradé ne peut plus se lier ni ubiquitiner APOBEC3G. APOBEC3G est alors incorporé en plus grande quantité dans les virions ce qui inhibe encore plus efficacement la réplication virale [77].

1.5 L'interférence à ARN

L'interférence à l'ARN est un mécanisme utilisant de petits ARN double brin et permettant d'inhiber de manière spécifique la transcription d'un gène.

1.5.1 Historique de l'interférence à l'ARN

1.5.1.1 Un phénomène découvert grâce à des pétunias....

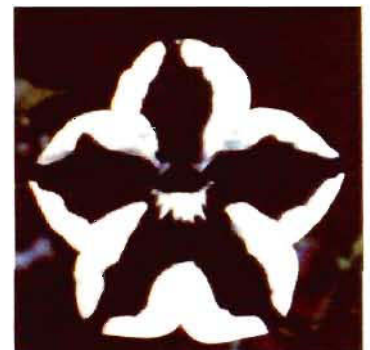
Le phénomène d'interférence à ARN fut observé pour la première fois en 1990 par Richard Jorgensen alors qu'il travaillait sur le mécanisme de coloration des pétunias. Son but était en effet d'intensifier la couleur des pétales. Pour cela il décida d'introduire dans le génome une copie supplémentaire du gène CHS (chalcone synthase) responsable de la pigmentation des pétunias. Il espérait ainsi obtenir des pétunias plus foncés du fait de la surexpression du gène. Ce ne fut pas le cas, il observa au contraire l'effet inverse de l'effet escompté. En effet, 42 % des pétunias dans lesquels avait été introduit le gène étaient Blancs ou bicolores [78] (Fig. 1.16).



Fleur sauvage



Fleur obtenue après introduction du gène



Fleur obtenue après introduction du gène

Figure 1.16 : Phénotype de la plante sauvage et des plantes transgéniques obtenues après introduction du gène CHS responsable de la pigmentation [78]

L'analyse des ARNm des fleurs blanches a montré que le taux d'ARNm correspondant au gène de la chalcone synthase était bien inférieur à celui observé chez les fleurs contrôles.

L'introduction du transgène CHS avait inhibé l'expression du gène endogène. Ce phénomène fut alors appelé "co-suppression" [78-81].

1.5.1.2 Puis observé chez C.elegans....

Il faudra attendre 5 ans avant que le phénomène ne soit à nouveau observé mais cette fois dans le règne animal, chez le nématode C.elegans par Su Guo et Ken Kemphues. Ces derniers, afin de comprendre la fonction d'une protéine de C.elegans, souhaitaient en bloquer la synthèse. Pour cela ils ont utilisé un ARN antisens, de séquence complémentaire à celle de l'ARNm. En guise de contrôle ils ont également administré un ARN sens, de séquence identique à celle de l'ARNm. À leur grand étonnement ils se sont aperçu que l'ARN anti sens et l'ARN sens inhibaient de la même manière la synthèse protéique. Ce mécanisme d'extinction de l'expression d'un gène par l'introduction d'ARN homologue fut nommé "interférence à l'ARN" [82, 83].

1.5.1.3 Enfin expliqué en 1998....

Néanmoins, ce n'est qu'en 1998, grâce aux travaux de Z.Fire et C Graig Mello, que le phénomène d'interférence à l'ARN put être expliqué. Ceux-ci montrèrent à l'aide d'un mélange d'ARN sens et anti sens que l'introduction d'ARN double brin provoquait la dégradation quasi totale de l'ARNm correspondant [84].

De plus, les recherches des équipes de Carthew et Sharp sur la drosophile ont permis de mettre en évidence que l'extinction des gènes de façon séquence-spécifique avait lieu au niveau post transcriptionnel [85, 86].

1.5.1.4 Et contre toute attente découvert chez les mammifères

Moins de dix ans après sa première observation, le mécanisme d'ARN interférence avait été observé chez les plantes, le ver C.elegans et la drosophile. Ce phénomène n'était pourtant pas attendu chez les mammifères. En effet, l'introduction

d'ARN double-brin dans les cellules de mammifères déclenche une réponse antivirale innée non spécifique : la réponse interféron. La synthèse d'interférons provoque en effet la dégradation des ARN messager de façon non spécifique.

Néanmoins, le phénomène d'interférence à l'ARN fut bel et bien observé chez les mammifères en 2001 par M.Sayda qui a démontré que le choix de la réponse cellulaire entre réponse interféron et interférence à l'ARN dépendait de la taille de l'ARN introduit dans les cellules. Ainsi l'introduction ou l'expression dans les cellules de mammifères de courts ARNdb (entre 20 et 24 nucléotides) permet de bloquer spécifiquement l'expression du gène ciblé.

1.5.1.5 L'ARNi une découverte qui mérite un prix Nobel

La découverte de l'interférence à l'ARN chez les mammifères provoque un réel engouement au sein de la communauté scientifique. En 2003, Science élit l'ARNi plus grande découverte scientifique de 2002. Et en 2006, Z. Fire et C. Graig Mello obtiennent le prix Nobel de médecine pour la découverte du phénomène d'interférence à l'ARN.

1.5.2 Mécanisme de l'interférence à l'ARN

IL existe chez les eucaryotes deux principaux types de petites ARN interférents :

- les siRNA (silencing RNA) proviennent du clivage de long ARNdb, d'origine virale, de transposons ou de transfections expérimentales. Ils clivent l'ARNm cible.
- Les miRNA (micro RNA) proviennent du clivage d'ARN endogène en forme d'épingle à cheveux. Ils sont souvent codés dans les introns des gènes qu'ils régulent, les séquences intergéniques et parfois les exons. Ils inhibent la traduction de l'ARNm cible.

La genèse des siRNA et miRNA bien que présentant quelques différences est sensiblement la même. Ne sera donc présenté ici que le mécanisme d'interférence à l'ARN lié aux siRNA.

Dans le cytoplasme, L'ARNdb exogène est reconnu et clivé par une ribonucléase de la famille de la RNase III : Dicer. Cette enzyme clive l'ARNdb en petits fragment de 21 à 25 nucléotides avec des extrémités 3' possédant 2 nucléotides non appariés et un phosphate en 5'. Ces petits fragment sont appelés small interfering ARN (siARN). (Fig. 1.17).

Dicer est localisé dans le cytoplasme et possède différents domaines lui permettant de pouvoir cliver les ARNm pour former les siRNA :

- un domaine ARN hélicase à l'extrémité N-terminale;
- un domaine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwile);
- deux domaines RNase III;
- un motif de liaison à l'ARNdb à l'extrémité C-terminale.

Le petit ARNdb associé à Dicer est recruté par une protéine de la famille des argonautes pour former le complexe RISC (RNA-induced silencing complexe). RISC est un complexe ternaire constitué de :

- une protéine de la famille des Argonautes : cette protéine est variable mais est le plus souvent AGO2 lorsqu'il s'agit de siRNA.
- TRBP, une hélicase ATP-dépendante permettant la dissociation de l'ARNdb;
- Dicer

La protéine TRBP dissocie les deux brins du siRNA. Le brin complémentaire de l'ARNm ciblé reste associé au RISC alors que le brin sens est relargué dans le cytoplasme. Le complexe RISC guidé par le siRNA se fixe alors sur l'ARNm cible. La protéine de la famille des Argonaute (lorsqu'elle possède une activité endonucléase)

clive alors l'ARNm qui sera par la suite dégradé par les exonucléases cellulaires et ne pourra donc être traduit en protéines [87, 88].

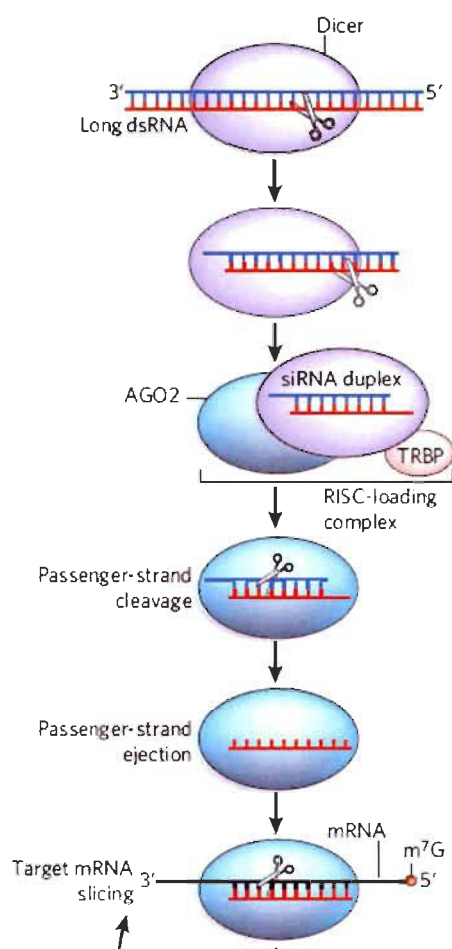


Figure 1.17 : Mécanisme de l'ARN interférence. L'ARNdb est clivé par l'enzyme dicer pour former de petits siRNA qui sont recruté par une protéine de la famille des argonautes pour former le complexe RISC. Après dissociation, le siRNA complémentaire se fixe à l'ARNm cible qui est clivé puis dégradé [87].

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

2.1 Lignées cellulaires utilisées

Les cellules 293T (humaine embryonnaire de rein), les MDTF (*Mus dunni* tail fibroblastes), TE671 (humaine de rhabdomyosarcome), les TE671 exprimant de façon stable la Banque de shRNA et les divers shRNA de l'étude sont toutes cultivées à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO₂ dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 0,1 mg/mL de pénicilline/streptomycine (P/S).

2.2 Plasmides utilisés

Divers plasmides ont été utilisés :

- pCMVΔR8.9 exprime les gènes viraux de structures gag et pol ainsi que les gènes régulateurs tat et rev du VIH sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus humain (hCMV).
- pSIH1-H1-puro dérivé du VIH, code pour le shRNA sous le contrôle du promoteur H1 et possède une cassette de résistance à la puromycine (Annexe 1).
- pCNCG dérivé de MLV exprime le gène rapporteur GFP (green fluorescent protein) sous le contrôle du promoteur interne CMV.
- pSIH1 et pCNCG sont tous deux des vecteurs rétroviraux. Ils comportent les 2 LTR (le LTR3' étant tronqué de sa séquence U3 pour désactiver le promoteur rétroviral), la séquence Ψ d'encapsidation, la séquence poly A permettant la stabilisation des ARNm et des séquences promotrices en amont du transgène. Ce sont leurs ARNm qui seront encapsidés, rétrotranscrits et permettront l'expression des shRNA ou de GFP dans notre cas.

- pCIG3B et pCIG3N expriment respectivement les gènes viraux gag et pol de B-MLV et N-MLV.
- pMDG code pour la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV G).
- pONY3.1 code pour les protéines virales gag-pol de EIAV (virus de l'anémie infectieuse équine). pONY8.0 dérive d'un vecteur EIAV et exprime le gène reporteur GFP [89].
- Le vecteur pCNCR, dérivé de MLV exprime RFP sous le contrôle du promoteur interne CMV. Il a été construit en clonant le fragment obtenu par la digestion NotI-AgeI de pCLNCX-FV1^{b[41]} (offert par le Dr Greg J. Towers) dans les sites NotI-AgeI (New England Biolabs) de pCNCG.
- pAPM (cadeau du Dr Jeremy Luban), dérive du VIH et permet la co-expression de shRNA de 30 nucléotides ainsi que du gène de résistance à la puromycine. pAPM-TRIM5 α et pAPM-Luc expriment des shRNA qui ciblent respectivement les ARNm de TRIM5 α et de la luciférase. pAPM-MDM2 #1, #2, #3 ont été construit en clonant dans pAPM, coupé avec les enzymes de restriction EcoRI et XhoI, les shRNA correspondants. Ces derniers ont été obtenus par PCR des oligonucléotides suivants (les régions complémentaires sont écrites en rouges alors que les nucléotides soulignés constituent la boucle).

#1,5'.TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGAATTTAGACAACCTGAAATTAGTGAAG
 CCACAGATGTAATTTCAGGTTGTCTAAATTCCTTGCCTAATGCCTCGGA
 #2,5'.TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCTGTCTATAAGAGAATTATATAGTGAAGC
 CACAGATGTATATAATTCTCTAATAGACAGGTTGCCTAATGCCTCGGA
 #3,5'.TGCTGTTGACAGTGAGCGACGTGCCAAGCTTCTCTGTGAATTAGTGAAGC
 CACAGATGTATTACAGAGAAGCTTGGCAGCCTGCCTACTGCCTCGGA;

Les amorces utilisées pour amplifier ces séquences sont :

miR30-5'-XhoI : 5'- aaggctcgagaaggtatatTGCTGTTGACAGTGAG; et miR30-3'-
 EcoRI : 5'-agccccttgaatTCCGAGGCAGTAGGCA

2.3 Production des virus utilisés par cotransfection de trois plasmides

Les vecteurs rétroviraux sont produits par cotransfection de trois plasmides dans des cellules 293T [90]. Si les plasmides varient en fonction du type de vecteur à produire on retrouve toujours :

- un plasmide d'emballage :

Il code pour les gènes gag (matrice et capsid) et pol (rétrotranscriptase, intégrase) qui sont sous la dépendance du promoteur transcriptionnel du hCMV (Cytomégalovirus humain) qui permet une expression relativement forte dans la plupart des cellules eucaryotes.

- un plasmide d'enveloppe :

Il code pour l'enveloppe du VSV (Virus de la Stomatite Vésiculeuse), qui possède un tropisme cellulaire beaucoup plus large que celui du VIH permettant ainsi l'infection de nombreuses lignées cellulaires de vertébrés. Le gène codant la protéine d'enveloppe est également sous la direction du promoteur CMV.

- un plasmide de transfert :

Il code pour le gène d'intérêt. Celui ci peut être dirigé par différents types de promoteurs (CMV, Facteur d'élongation α , Phosphoglycérate Kinase). Les deux régions LTR (R et U5) contiennent les régions "cis" qui permettent la synthèse de l'ADN proviral puis son intégration dans le génome de la cellule hôte. Ces deux étapes nécessitent l'action de la reverse transcriptase et de l'intégrase.

L'ensemble des virus utilisés ont été produits par cotransfection de 3 plasmides dans des cellules 293T. Pour cela une solution des 3 plasmides adéquats (Tableau 2.1) est ajoutée à 1ml (si la transfection est réalisée dans des Pétri de 10cm) ou 200 μ L (si la transfection est réalisée dans des plaques 6 puits) de DMEM sans SVF ni P/S et est mélangée avec 45 μ L (Pétri 10cm) ou 9 μ L (plaque 6 puits) de polyéthylénimine (Polysciences). Cette solution est ensuite ajoutée à des 293T entre 70 et 80 % de

confluence. 12 à 16 heures après transfection, les cellules sont lavées au PBS et replacées en culture dans du milieu frais. Deux jours après transfection, le surnageant des cellules contenant les virus est prélevé, clarifié 10 min à 3000 rpm à température ambiante puis aliquoté et conservé à -80°C.

Lorsque les transfections sont réalisées dans des Pétri de 10cm, 5µg de plasmide d'enveloppe et 10µg de plasmide d'empaquetage et de transfert sont utilisés. Pour des transfections en plaque 6 puits, seulement 1µg de plasmide d'enveloppe et 2µg de plasmide d'empaquetage et de transfert sont utilisés.

Tableau 2.1

Plasmides utilisés pour la production des vecteurs rétroviraux

Vecteur rétroviral	Plasmide d'empaquetage	Plasmide d'enveloppe	Plasmide de transfert
B-MLV _{GFP}	pCIG3B	pMDG	pCNCG
N-MLV _{GFP}	pCIG3N	pMDG	pCNCG
B-MLV _{RFP}	pCIG3B	pMDG	pCNCR
N-MLV _{RFP}	pCIG3N	pMDG	pCNCR
VIH-Banque	pCMVΔR8.9	pMDG	pSIH1-H1-puro-Banque
VIH- MDM2(C147)	pCMVΔR8.9	pMDG	pSIH1-H1-puro-MDM2(C147)
EIAV _{GFP}	pONY3.1	pMDG	pONY8.0
pAPM-Luc	pCMVΔR8.9	pMDG	pAPM-Luc
pAPM-TRIM5α	pCMVΔR8.9	pMDG	pAPM-TRIM5α
pAPM-MDM2 #1, #2, #3	pCMVΔR8.9	pMDG	pAPM-MDM2 #1,#2,#3

2.4 Transduction de cellules

Les cellules TE671 sont mises en culture dans des plaques 6 puits, chaque puits contenant 125000 cellules. Le lendemain les milieux de culture sont remplacés par 2mL des solutions des vecteurs souhaités tels que VIH-Banque et VIH-47. Deux jours après transduction, les cellules sont traitées avec 1µg/mL de puromycine (EMD Biosciences) pendant 2 à 3 jours, pour uniquement conserver les cellules transduites. La concentration de puromycine a été déterminée de façon à tuer la totalité des cellules non résistantes après 1 à 2 jours de traitement. Le traitement a été recommencé périodiquement lors de ce travail.

2.5 Agents chimiques

L'inhibiteur de protéasome MG132 (Sigma Aldrich), dilué dans du DMSO est utilisé à une concentration finale de 1µg/mL. Nutlin3, (Sigma Aldrich) inhibiteur de liaison entre MDM2 et p53 est utilisé à 2µM, 4µM et 8µM. L'inhibiteur de reverse transcriptase, l'analogue de thymine AZT est utilisé à 30µM et ajouté 15 min avant l'infection des cellules.

Le Trioxyde d'arsenic (Sigma) à 0,1 M est préparé dans 1 N de NaOH puis dilué à 10mM dans du PBS. Le pH est ajusté à 7,0 avec du HCl. L'As₂O₃ est dilué à nouveau avec du PBS et conservé à 4°C durant 3 mois sans perte d'activité.

2.6 Infection et tri des cellules GFP positives

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits, chaque puits contenant 25000 cellules. Le lendemain les cellules sont infectées avec les vecteurs N-MLV_{GFP} ou B-MLV_{GFP}. Trois jours après infection, les cellules sont trypsiniées et fixées avec du Formaldéhyde 2 %.

L'expression de GFP est alors mesurée dans 10000 cellules avec un cytomètre de flux FC500 MPL (Beckman Coulter) puis analysée avec le logiciel CXP.

2.7 Amplification par PCR des shRNA exprimés dans les clones d'intérêt

Afin d'amplifier les shRNA exprimés par chaque clone, 150 ng des ADNs totaux extraits (Qiagen DNeasy tissue kit) sont soumis à une réaction PCR de 35 cycles dans un volume final de 50 µL contenant la polymérase Phusion (New England Biolabs) et le tampon GC spécialement conçu pour les échantillons difficiles à dénaturer. Une température d'hybridation de 58°C et les amorces suivantes ont été utilisées :

pSIH1 3435 : 5' - CTCAGACGAGTCGGATCTCC

pSIH1 Rev GNH : 5' - TCCCAGGCTCAGATCTGGTCTA

Ces amorces ont été respectivement conçues à l'aide du logiciel McVector et fournies avec la banque de shRNA commandée chez *Systems Biosciences*.

2.8 Clonage des shRNA amplifiés par PCR dans le vecteur pSIH1H1

Les produits de PCR sont purifiés (Qiagen PCR purification kit), puis digérés par EcoRI (285 U/mL) et KpnI (229 U/ml) pendant 2 h 30 à 37°C. Après migration sur un gel d'agarose 1,5 %, les produits de digestion sont extraits et élués dans 30µL de Tris-HCL pH 7,5.

La ligation est réalisée sur la nuit à 15°C dans un volume final de 20µL avec 10µL des produits de PCR digérés, 40ng de vecteur pSIH1H1-puro digéré préalablement avec EcoRI (285 U/mL) et KpnI(229 U/mL) et enfin 20000 U/mL de ligase de phage T4.

2 µL des produits de ligation sont électroporés (Electroporator 2510 de chez Eppendorf) dans des bactéries compétentes Ecoli DH5α puis étalés sur des géloses avec ampicilline.

2.9 Séquençage des shRNA exprimés dans les clones d'intérêt et identification de la cible du shRNA

L'ADN plasmidique de chaque colonie obtenue suite au clonage des shRNA dans le vecteur pSIH1-H1, est extrait par miniprep (Qiagen) puis envoyé à séquencer (Plateforme d'analyses biomoléculaires, Université Laval, Québec, CANADA) avec l'amorce suivante pSIH1 3435 : 5'- CTCAGACGAGTCGGATCTCC.

L'identification de l'ARNm cible des shRNAs est réalisée par une analyse Blast dans la base de données *Reference mRNA Sequences* à partir de la séquence complémentaire inversée du brin antisens du shRNA (cf. Annexe 2).

2.10 Suivi de la synthèse de l'ADN de MLV

125000 TE671 transduites avec la banque ou 250000 TE671 transduites avec le shRNA ciblant l'ARNm de MDM2 sont mises en culture dans 2mL de milieu dans des plaques 6 puits. Le lendemain les cellules sont traitées 2h avant infection, dans les puits où cela est nécessaire avec 30µM d'AZT (Sigma Aldrich). Préalablement à l'infection les virus N-MLV_{GFP} ou B-MLV_{GFP} sont traités à la DNaseI (25 U/mL de solution de virus, New England Biolabs) pendant 30 min à température pièce. Les cellules sont ensuite infectées avec 50µL de N-MLV_{GFP} ou B-MLV_{GFP} et traitées avec 1µg/mL de MG132 (SigmaAldrich) lorsque cela est requis. Après 6 heures d'infection, le surnageant est remplacé par du milieu frais et les cellules replacées à 37°C pour 6 heures supplémentaires.

L'ADN génomique total est ensuite extrait (Qiagen DNeasy tissue kit) et digéré avec DpnI (150 U/mL de solution d'ADN New England Biolabs) pendant 2 h à 37°C. Comme DpnI ne clive que l'ADN méthylé, cette étape de digestion permet de diminuer les risques de contamination par de l'ADN plasmidique.

Les essais de PCR quantitative en temps réel ont été réalisés en duplicata à l'aide d'un Light Cycler (Roche) en utilisant 2µL de chaque échantillon et 10µL de QuantiTect

SYBR Green PCR Master mix (Qiagen) dans un volume final de 20 μ L. La PCR comportait 45 cycles et l'hybridation était réalisée à 58°C.

Les amorces utilisées pour amplifier le gène GFP (rapporteur de la synthèse de l'ADN viral) et le gène normalisateur GAPDH ont été synthétisées par SigmaAldrich.

GFPs :	5'- GACGACGGCAACTACAAGAC
GFPas :	5'-TCGTCCATGCCGAGA GTGAT
hGAPDH(AS) :	5'- TGAGCTTGACAAAGTGGTCG
hGAPDH(S) :	5'-GTCAGTGG TGGACCTGACCT.

Des dilutions de 10 en 10 du plasmide pCNCG ou d'ADN génomique ont été utilisées pour produire respectivement les courbes standards de GFP et GAPDH. Les analyses ont été réalisées à l'aide de logiciel LightCycler quantification Software en utilisant la méthode de la dérivée maximale.

2.11 Immunobuvardage de type Western

Les cellules sont lysées sur glace dans du tampon RIPA (cf. Annexe 3) puis centrifugées à 13000 rpm 10 min à 4°C. La quantité de protéines est mesurée dans le surnageant des échantillons par un test au Bradford. Les surnageants de chaque échantillon, mélangés à du tampon Laemmli (cf. Annexe III) sont séparés sur un gel dénaturant SDS-PAGE 10 % puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Celle-ci est saturée 1h dans du lait 10 % à température pièce. La membrane est ensuite incubée avec les anticorps primaire sur la nuit à 4°C puis rincée 4 fois 10 min avec du TBS Tween (cf. Annexe III). Puis la membrane est incubée avec l'anticorps goat anti-mouse IgG-HRP : sc-2005 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californie, USA) 1 h à température pièce puis rincée 2 fois 5 min et 2 fois 10 min toujours dans du TBS Tween. Les anticorps primaires utilisés sont : un monoclonal de souris anti-MDM2 (SMP334, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californie, USA) et un monoclonal de souris anti-Actine (MAB1501, Chemicon, Billerica, Massachusetts, USA) dilué au 1/1000.

CHAPITRE 3

CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

En réponse aux infections virales, les mammifères ont mis en place différents mécanismes de défenses. En plus de l'immunité innée et de l'immunité acquise, un nouveau type d'immunité appelée immunité intrinsèque a récemment été identifié. Elle est constituée de protéines aux propriétés antirétrovirales nommées facteurs de restriction. Un de ces facteurs est la protéine TRIM5 α , qui est capable de bloquer la réplication de certains rétrovirus peu après leur entrée dans la cellule [24]. L'importance de TRIM5 α dans la réponse antivirale est soulignée par l'augmentation de son expression par les interférons de type I [91, 92].

TRIM5 α est un membre de la famille à motif tripartite qui possède les domaines RING, B-Box et Coiled-coil. TRIM5 α possède également à son extrémité C-terminale un domaine SPRY responsable de la spécificité de la restriction [33]. Ainsi, les différences de séquence entre les domaines SPRY des protéines humaines (TRIM5 α_{hu}) et du macaque rhésus (TRIM5 α_{Rh}) expliquent la capacité de TRIM5 α_{Rh} à inhiber le VIH alors que TRIM5 α humain en est incapable. Si le domaine SPRY est un déterminant de la spécificité de la restriction, la séquence en acide aminé des protéines de capsid virale en est également un. Ainsi TRIM5 α_{hu} possède une activité de restriction spécifiquement dirigée contre la souche N tropique du virus de leucémie murine (N-MLV) mais non contre la souche B tropique (B-MLV) qui ne diffère pourtant que d'un seul acide aminé.

Bien que le mécanisme d'action de TRIM5 α ne soit que partiellement connu, l'initiation de la restriction nécessite la reconnaissance spécifique de déterminants de la capsid virale (CA) par le domaine SPRY. Suite à cette interaction qui intervient rapidement après l'entrée du virus dans la cellule, la réplication rétrovirale peut être inhibée de différentes façons. Premièrement, TRIM5 α accélère le déshabillage des

cœurs viraux provoquant une diminution des capsides particulières sans toutefois augmenter la quantité de protéine de capside soluble [93]. Deuxièmement, TRIM5 α inhibe la synthèse de l'ADN viral via un mécanisme impliquant le protéasome. En effet, l'utilisation d'inhibiteur du protéasome, tel que MG132, permet de rétablir l'accumulation des produits de transcription inverse sans toutefois abolir la restriction [48, 51]. Troisièmement, TRIM5 α altère la migration du complexe de pré-intégration vers le noyau [48, 51].

L'inhibition efficace du VIH-1 par TRIM5 α nécessite la présence de cyclophiline A dans différentes lignées cellulaires simiennes [94]. Au contraire, dans les cellules humaines, l'interaction entre la cyclophiline A et la capside virale semble protéger le VIH-1 de la restriction par TRIM5 α [95]. Il est intéressant de constater que différentes lignées cellulaires ne présentent pas de restriction alors que TRIM5 α est exprimé. Ainsi différents orthologues de TRIM5 α sont incapables d'inhiber le VIH-1 dans les cellules canines MDTF [41]. De la même façon, les cellules 17H1, qui proviennent des cellules humaines TE671 dont la restriction est spécifiquement dirigée contre N-MLV mais pas contre B-MLV, sont permissives à l'infection par N-MLV alors que TRIM5 α est toujours exprimé [96]. Toutes ces observations suggèrent l'existence de facteurs cellulaires inconnus impliqués dans l'activité de restriction de TRIM5 α .

L'objectif de ce projet consistait donc à isoler ces protéines cellulaires impliquées dans l'activité de restriction de TRIM5 α_{hu} et d'élucider leur mécanisme d'action au niveau moléculaire.

CHAPITRE 4

RESULTATS

4.1 Crible génétique par perte de fonction pour identifier des partenaires cellulaires de TRIM5 α

Afin d'identifier les protéines impliquées dans l'activité de restriction de TRIM5 α , un crible génétique par perte de fonction basé sur l'interférence à l'ARN a été réalisé. Pour cela, une banque de 200000 shRNA ciblant 47 400 ARNm humains sous forme plasmidique a été utilisée. Afin d'obtenir des lignées cellulaires stables la banque devait être sous forme de vecteurs rétroviraux pseudotypés avec l'enveloppe du Virus de la stomatite vésiculeuse (VSVG). Des cellules 293T ont été cotransfectées avec 3 plasmides :

- pMDG codant pour l'enveloppe de VSVG;
- pCMV Δ R8.9 codant pour les protéines Gag et Pol du VIH-1;
- les plasmides pSIH1-H1-puro-shRNA codant chacun pour un shRNA différent et possédant un gène de résistance à la puromycine.

La banque de shRNA sous forme de vecteurs rétroviraux à été transduite dans des cellules humaines de rhabdomyosarcome TE671. Ces cellules expriment de façon endogène TRIM5 α humain qui possède une forte activité de restriction contre le virus de la leucémie murine N tropique (N-MLV) mais pas contre la souche B tropique (B-MLV). Les cellules transduites, c'est-à-dire exprimant un shRNA furent sélectionnées à la puromycine. Afin de sélectionner les TE671 transduites présentant une permissivité plus élevée pour N-MLV, celles ci furent infectées à de faibles multiplicités d'infection avec un vecteur N-MLV exprimant GFP de façon à avoir 0,1 % de cellules infectées. Les cellules GFP+, c'est-à-dire les cellules devenues permissives à l'infection par N-MLV furent triées et isolées par cytométrie de flux. Sur 270000 cellules exprimant GFP, 192 clones individuels ont été isolés, mais seuls 60 ont pu être analysés de façon plus approfondie.

Afin de sélectionner parmi les cellules GFP positives celles présentant l'activité de restriction pour N-MLV la plus faible, un second tour de sélection a été mis en place. Les cellules GFP positives ont été infectées avec N-MLV et B-MLV exprimant RFP. Nous avons ainsi pu comparer la permissivité des clones exprimant GFP pour N-MLV et B-MLV en réalisant le ratio B/N, soit le ratio entre le pourcentage des cellules infectées par B-MLV et N-MLV. Ainsi, 12 lignées clonales présentant les plus faibles restrictions pour N-MLV (faible ratio B/N) ont pu être isolées (Fig. 4.1).

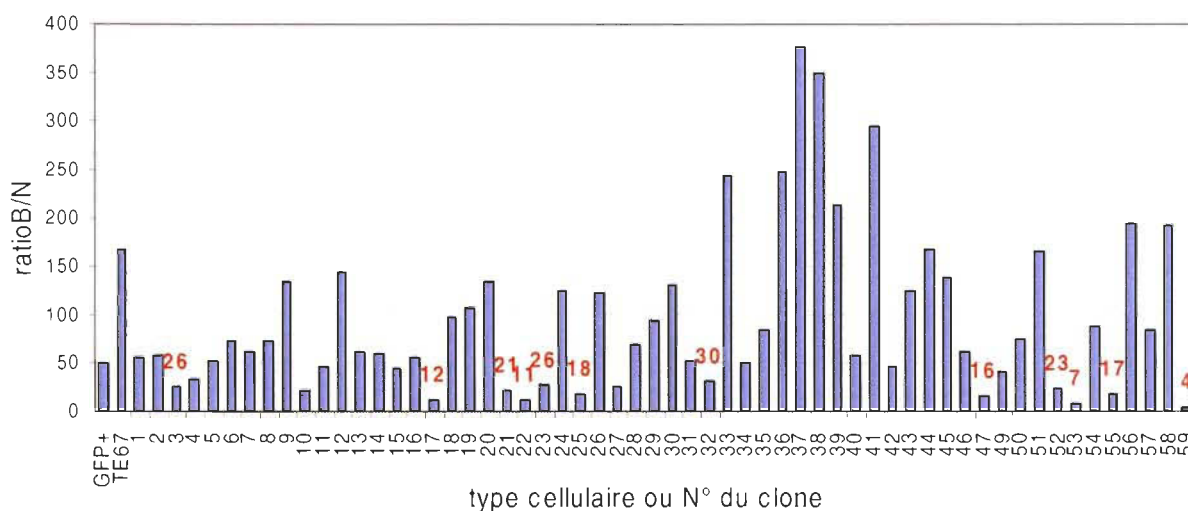


Figure 4.1 : Niveau de restriction de N-MLV dans les différentes lignées clonales

Après extraction des ADN totaux de chaque clone, les shRNA exprimés furent amplifiés par PCR, clonés à nouveau dans le vecteur pSIH1H1-puro et séquencés. Une analyse Blastn des résultats de séquençage a permis d'identifier les ARNm cibles des shRNA.

La dernière étape consiste à la validation des candidats. Pour vérifier si les shRNA identifiés sont réellement responsables de la perte de restriction observée, ils sont transduits à nouveau dans des TE671 naïves qui sont ensuite infectées par des vecteurs N-MLV_{GFP} et B-MLV_{GFP}. Les phénotypes de restriction sont alors comparés à ceux obtenus lors du second tour de sélection (Fig. 4.2).

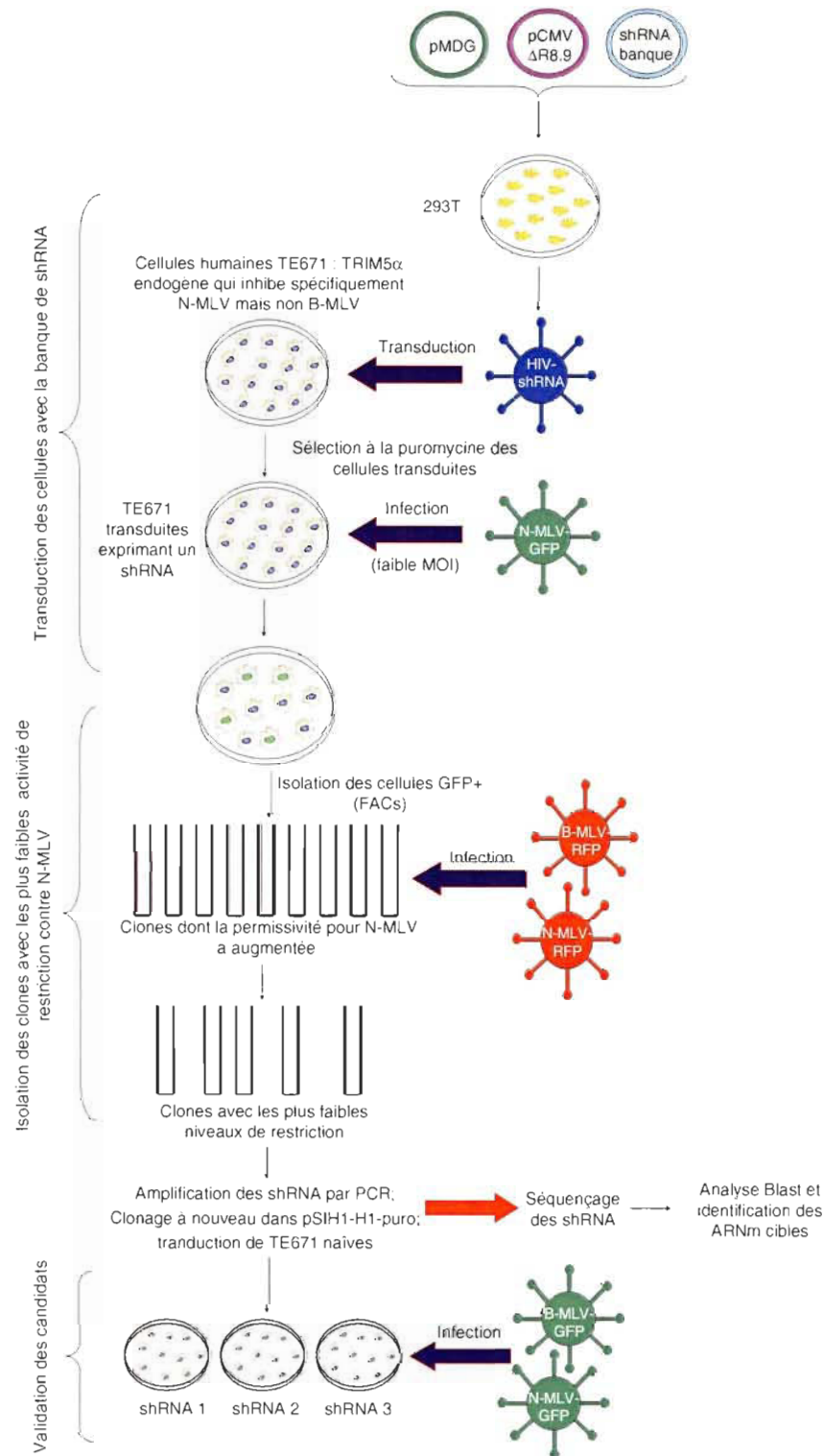


Figure 4.2 : Démarche expérimentale. Les TE671 exprimant TRIM5 α endogène humain sont transduites avec la banque de shRNA puis infectées avec N-MLV_{GFP}. Les cellules GFP+, permissives à l'infection sont triées et infectées par N-MLV_{RFP} et B-MLV_{RFP} pour sélectionner les cellules présentant les plus faibles niveaux de restriction contre N-MLV. Les cibles des shRNA exprimés dans les clones d'intérêt, sont déterminées par analyse Blast. Enfin pour valider le crible, des TE671 naïves sont transduites avec les shRNA candidats puis à nouveau infectées par N-MLV_{GFP} et B-MLV_{GFP} pour mesurer le niveau de restriction de N-MLV.

4.2 Identification des cibles des shRNA exprimés dans les lignées clonales d'intérêt

Les shRNA exprimés dans les clones d'intérêt ont été clonés, dans le vecteur d'origine pSIH1H1-puro, après amplification par PCR.

Lors de la réalisation du crible, environ 50 % des TE671 naïves ont été transduites par la banque de shRNA. Il est donc possible que certaines cellules aient été transduites plus d'une fois. Les phénotypes de chaque lignée clonale pourraient donc être la conséquence de l'expression de plusieurs shRNA dans la cellule. Afin de vérifier cette éventualité, pour chaque clone isolé par le crible, plusieurs plasmides provenant des différentes colonies obtenues suite au clonage des shRNA ont été envoyés à séquencer.

En raison de difficultés lors de l'amplification par PCR et du clonage, peu de shRNA ont pu être amplifiés et reclés.

Tableau 4.1

Nombre de shRNA différents obtenus suite au clonage du shRNA exprimé dans chaque clone de départ

N° Clone	Nombre de constructions séquencées	Nombre de shRNA différents
3	4	2
17	5	2
21	0	0
22	0	0
23	3	3
25	4	3
32	0	0
47	5	1
52	5	5
53	0	0
55	0	0
59	5	3

Mis à part le clone 47, tous les autres semblent exprimer plusieurs shRNA (Tableau 4.1). Néanmoins en ce qui concerne le clone 17, 4 des 5 constructions séquencées sont identiques. Ceci suggère que la dernière colonie serait une contamination. Lorsque tous les shRNA issus d'une même lignée clonale diffèrent, il peut soit s'agir d'une transduction multiple soit d'un problème de contamination lors de la PCR (clones 23 et 52).

Afin d'identifier les cibles potentielles des shRNA, des analyses Blast à partir de la séquence complémentaire inverse du brin antisens des shRNA ont été réalisés dans la banque de donnée refseq.rna. En effet, les shRNA de la compagnie SBI, sont conçus volontairement avec des mésappariements de façon à ce que le brin antisens code pour l'ARN complémentaire de l'ARNm cible.

Lors de l'analyse, seuls les candidats parfaits d'au moins 18 nucléotides de longueur ont été considérés (Tableau 4.2).

Tableau 4.2

Cibles potentielles des shRNA isolés

clone	colonies	séquence à blaster	résultats blast	longueur de la séquence	N° d'accès Pub Med
3	2	CGTACGTGGCTCTGTCCAAGACATACA	ALPPL2	25	NM_031313
	3=4=5	GAAATACAGCCATGTGATCGATCATAT	DYNC1LI1	27	NM_016141
17	1=2=3=4	GAAGCCTGCAAGTCTAAGATCTCCATC	STAR	27	NM_000349.2
	5	TAAAGGACTTCTGCTTTGCTCTTCAGA	P450	23	NM_017460.3
			LOC100130709	18	XM_001726327.1
			CBF1	18	NM_004882.3
			HIVEP3	18	NM_024503.2
23	1	AGATATTCCTCTTTAATGGCATGTAAG	ABCA10	19	NM_080282.3
	2	ATATCCAACAACAATAGGCTAGATTAA	< 16 nucléotides		
	3	TTAATCCCGTTATGGACTCTGTCTCCA	BTN3A1	27	NM_194441
25	1=4	TGCCACGTGGGCTCATATGGGGCTGG	CDKN1A	27	NM_000389
	2	TAATGTACTTCTATCACTGCATTTATT	PTH2R	27	NM_005048
	3	GAAGCAGTGTCTGTGGTTTGCCATGCA	CST8	27	NM_005492
47	1=2=3=4	TAACCCTAGGAATTTAGACAACCTGAA	MDM2	23	NM_002392
52	1	TAATGCTCGCTTCTGATTGATGTTG	aucun candidat		
	2	CAAACATGGTTATCTCTGTCTAGTGACT	aucun candidat		
	3	TCTTGCTCCATGCTGTCCATATTTATG	> 16 nucléotides		
	4	GTATCTACACATTGTTATAAGCCAAAA	> 16 nucléotides		
	5	CAATGACTGAAACCTTCTTGGAAGAA	> 16 nucléotides		
59	2=3=4	GACAGAACCTCTTGATGATCTTGTA	STX8	27	NM_004853
	5	ACTGTCATTGCTAATCTGAACATTAT	TTC33	26	NM_012382
	6	TCAAGCAGATCCTGGGCGGCTTCACT	aucun candidat		

4.3 Vérification du phénotype de restriction causé par chaque shRNA isolé

Afin de vérifier que les shRNA identifiés soient bien responsables de la restriction observée lors du second tour de sélection, des TE671 naïves ont été transduites avec chacun des shRNA isolés puis infectées avec des doses croissantes de N-MLV_{GFP} et B-MLV_{GFP}.

Sur les 13 lignées cellulaires obtenues :

- Deux (clones 523 et 592) sont moins permissives à l'infection par N-MLV que les TE671 transduites avec l'ensemble de la banque comme contrôle (Fig. 4.3C et D).
- Huit sont autant infectées par N-MLV que la banque.
- Deux lignées, les clones 33 et 175, sont deux fois plus infectées par N-MLV (Fig. 4.3A et D).
- Seul le clone 47, présente un pourcentage de cellules infectées par N-MLV cinq fois supérieur à celui du contrôle (Fig. 4.3A).

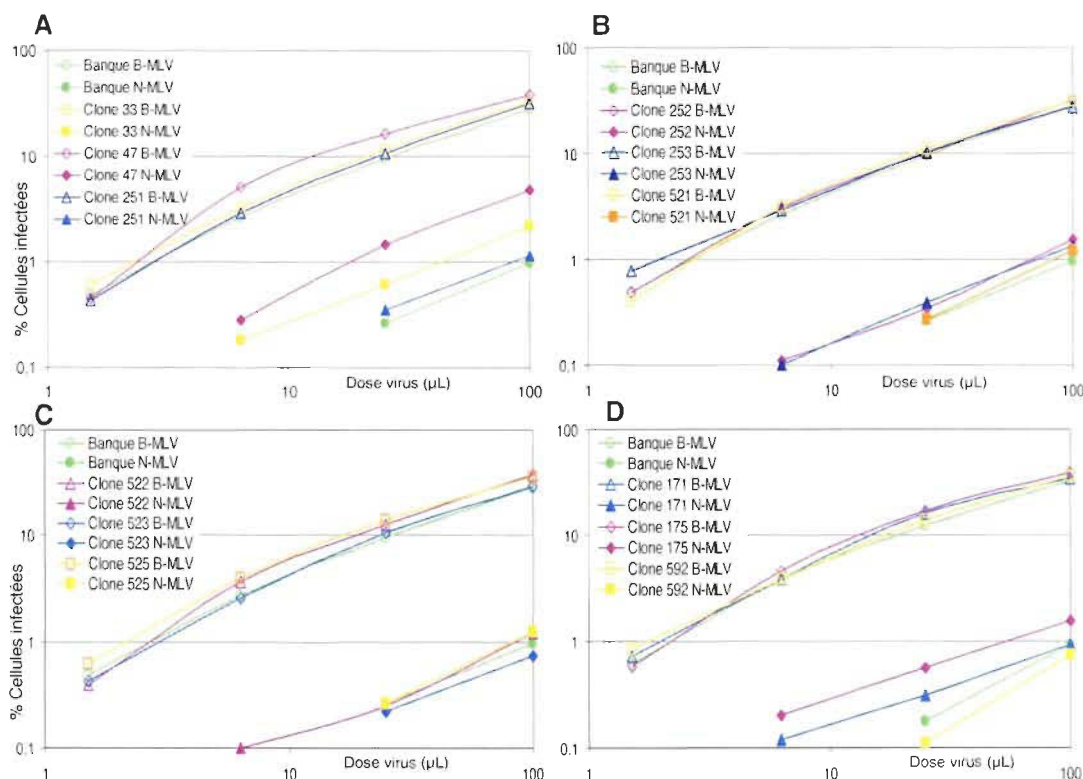


Figure 4.3 : Titration de N-MLV et B-MLV. Des TE671 transduites avec les shRNA isolés à partir des clones d'intérêt ont été infectées avec N et B-MLV_{GFP}.

Seul le clone 47 dont la permissivité pour N-MLV est la plus élevée a été retenu pour la suite des expériences. Le shRNA exprimé, cible l'ARNm de l'oncoprotéine MDM2, bien connue pour son rôle de régulateur du gène suppresseur de tumeur p53. Il a récemment été montré que MDM2 posséderait une activité antivirale contre le VIH en participant à l'ubiquitination de la protéine virale Vif [77]. L'existence de cibles secondaires pour ce shRNA est peu probable puisque la recherche BLAST dans la banque de données de NCBI n'a donné aucun autre résultat parfait. Ainsi les 27 nucléotides du brin sens du shRNA exprimé dans le clone 47 correspondent parfaitement à la séquence de MDM2 : l'homologie est donc 100 %. Le second résultat obtenu par l'analyse Blast est SPINK5, un inhibiteur de peptidase de sérine, type 5 de Kazal. Il ne présente que 55 % d'homologie avec la séquence du shRNA exprimé dans le clone 47.

```

ref|NM_006881.2| Homo sapiens Mdm2, transformed 3T3
cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)
(MDM2), mRNA, Length=1540

shRNA clone 47  2 ATAACCCTAGGAATTTAGACAACCTG  27
                |||||
MDM2 mRNA      994 ATAACCCTAGGAATTTAGACAACCTG  1019

```

Figure 4.4 : Résultat de l'analyse blast du shRNA exprimé dans le clone 47

4.4 Validation du knockdown de MDM2

Le knockdown de MDM2 provoque une diminution de 2 à 5 fois de la restriction de N-MLV comparé aux cellules contrôles composées de TE671 transduites avec l'ensemble de la banque de shRNA. (Fig. 4.5A). La diminution de l'expression de MDM2 a été confirmée par Western Blot. Afin d'améliorer la détection de la protéine, les cellules ont soit été traitées pendant 48 h avec la drogue Nutlin3a qui provoque une augmentation de l'expression de MDM2 (Fig. 4.5B), soit pendant 6 h au MG132, un inhibiteur du protéasome, pour éviter la dégradation rapide de la protéine (Fig. 4.5C). Le shRNA contre MDM2 ne permet pas une perte totale de l'expression de la protéine.

Afin d'écarter la possibilité que d'autres cibles du shRNA, autre que MDM2, soient responsables du phénotype observé, nous avons construits trois autres shRNA sensés cibler MDM2 ainsi qu'un shRNA contrôle ciblant l'ARNm de la luciférase. Deux des trois constructions diminuent l'expression de MDM2, le shRNA # 2 étant le plus efficace (Fig. 4.5D). Aucun de ces shRNA ne modifie la réplication de B-MLV mais l'expression du shRNA # 2 augmente l'infectivité de N-MLV d'environ deux fois (Fig. 4.5E). Ceci confirme que le knockdown de MDM2 affecte la restriction de N-MLV. L'effet du shRNA #2 sur la restriction du N-MLV étant plus faible que celui du shRNA isolé de la banque (2 fois contre 3 à 5 fois), nous avons utilisé ce dernier pour la suite de nos expériences.

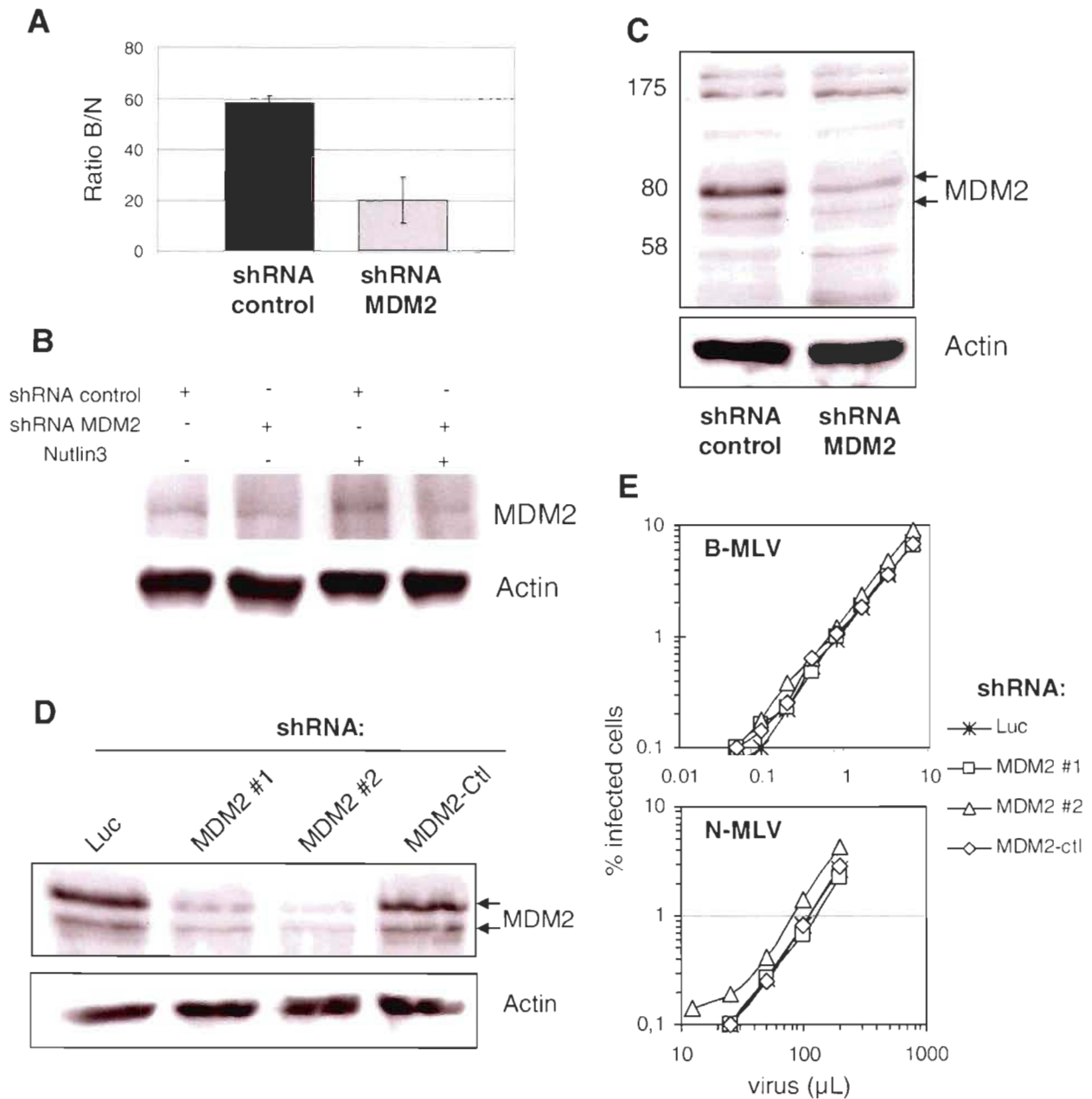


Figure 4.5 : Le knockdown de MDM2 diminue la restriction du N-MLV.

A) Restriction de N-MLV dans les TE671 transduites avec l'ensemble de la banque comme contrôle ou le shRNA dirigé contre MDM2 issu du crible. **B et C)** Western Blot de MDM2 sur des TE671 transduites avec l'ensemble de la banque ou le shRNA contre MDM2 traitées ou non. **B)** avec Nutlin3a ou **C)*** avec MG132. **D)*** 3 shRNA supplémentaires ciblant MDM2 furent construits dans un vecteur rétroviral (pAPM) puis transduit dans des TE671. Un vecteur exprimant un shRNA contrôle ciblant la luciférase fut également transduit. MDM2 fut détecté par WesternBlot. **E)*** Les mêmes cellules qu'en D furent infectées avec des doses croissantes de N et B-MLV exprimant GFP. Le pourcentage de cellules infectées est détecté 3 jours après par cytométrie de flux.

* Expériences réalisées par Alexandra Létourneau-Hogan

Le crible génétique a permis d'isoler des lignées cellulaires devenu permissives à l'infection par N-MLV. Cette perte de restriction peut être la conséquence de deux phénomènes. Soit le shRNA exprimé cible une protéine importante pour l'activité de restriction de TRIM5 α , soit il cible un autre facteur de restriction (ou un de ses cofacteurs) qui inhibe la réplication du N-MLV. Nous avons donc vérifié si MDM2 était un cofacteur de TRIM5 α .

4.5 L'effet antiviral de MDM2 dépend de l'activité de restriction de TRIM5 α

Théoriquement, MDM2 aurait pu être impliqué dans la restriction de N-MLV indépendamment de TRIM5 α . En effet, d'autres ubiquitine ligases de la famille TRIM comme TRIM19 (PML), TRIM25 et TRIM26 diminuent l'infectivité de N-MLV de façon similaire à MDM2 [97]. Afin de vérifier si l'effet de MDM2 sur la restriction de N-MLV dépendait ou non de l'activité de TRIM5 α , l'expression de MDM2 et TRIM5 α ont été diminuées simultanément par double knockdown. Les TE671 furent transduites avec des shRNA ciblant soient MDM2, TRIM5 α ou les deux protéines. Les cellules transduites furent ensuite infectées soit avec le vecteur contrôle B-MLV_{GFP} soit avec N-MLV_{GFP} ou EIAV_{GFP}.

Comme attendu, les knockdowns de MDM2 et TRIM5 α n'ont aucun effet sur l'infectivité de B-MLV car ce virus n'est pas soumis à restriction par TRIM5 α_{hu} .

Au contraire, l'infectivité de N-MLV est augmentée d'environ 5 fois par le simple knockdown de MDM2 et d'environ 50 fois par le simple knockdown de TRIM5 α . L'expression du shRNA ciblant l'ARNm de TRIM5 α abolit ainsi la restriction du N-MLV. Par contre le double knockdown de MDM2 et TRIM5 α n'a aucun effet additionnel sur l'infectivité de N-MLV par rapport au simple knockdown de TRIM5 α , impliquant que l'effet de MDM2 sur la restriction de N-MLV dépend de l'activité de TRIM5 α (Fig. 4.6A).

Des résultats similaires sont obtenus avec un autre virus inhibé par TRIM5 α_{hu} , le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV). Ainsi le double knockdown de TRIM5 α et MDM2 ne présente pas d'effet additionnel par rapport au simple knockdown de TRIM5 α qui abolit la restriction du EIAV. Le simple knockdown de MDM2 entraîne une augmentation de l'infectivité du EIAV d'environ deux fois. Cette amplitude est plus faible que pour le N-MLV car TRIM5 α inhibe moins efficacement la réplication du virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV). (Fig. 4.6B).

Comme le double knockdown de TRIM5 α et MDM2 ne présente pas d'effet additionnel sur l'infectivité de virus soumis à restriction par TRIM5 α humain comme N-MLV et EIAV par rapport au simple knockdown de TRIM5 α , ceci signifie que l'effet antiviral de MDM2 dépend de l'activité de TRIM5 α .

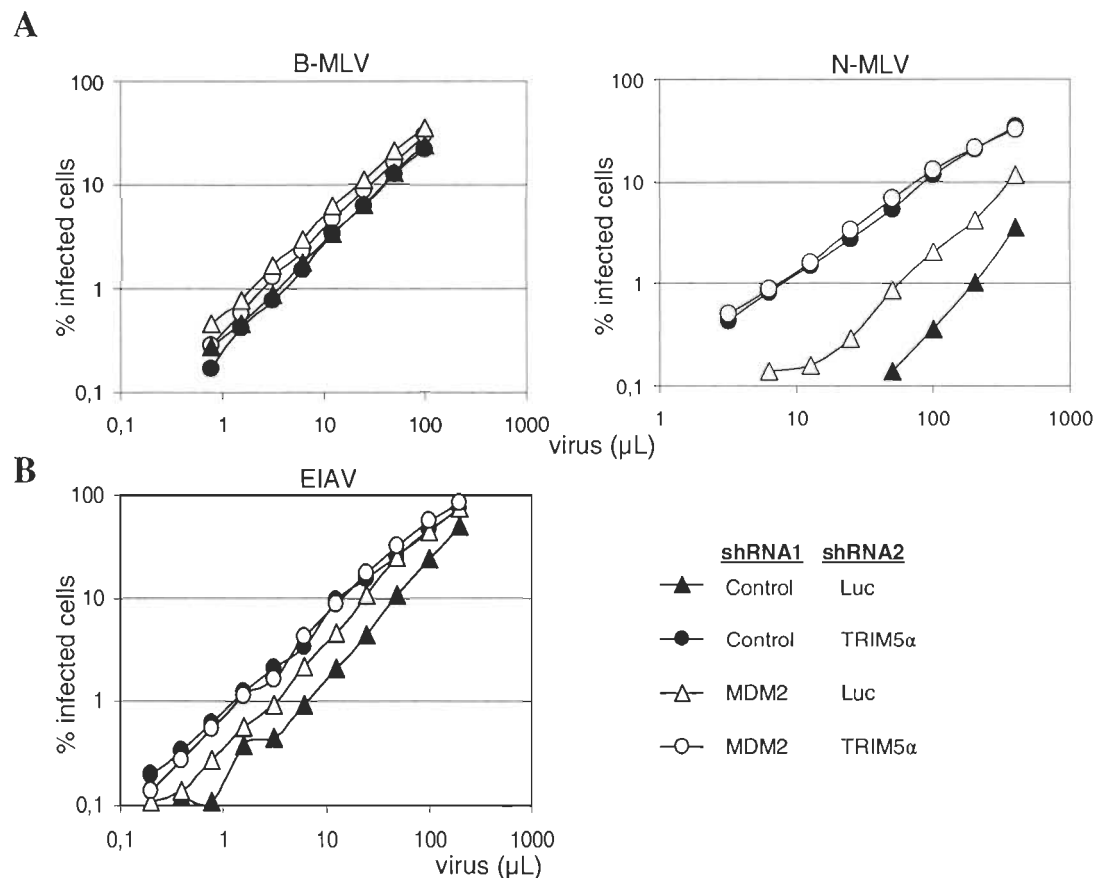


Figure 4.6 : MDM2 est impliqué dans l'activité de restriction de TRIM5 α . Les TE671 transduites avec l'ensemble de la banque comme contrôle ou le shRNA contre MDM2 furent transduites avec un shRNA dirigé contre la luciférase ou dirigé contre TRIM5 α puis infectées avec B et N-MLV_{GFP} (A) ou EIAV_{GFP} (B).

4.6 Le knockdown de MDM2 diminue la sensibilité de N-MLV au trioxyde d'arsenic As_2O_3

Le trioxyde d'arsenic est une drogue qui inhibe l'activité de restriction de TRIM5 α et TRIMCyp selon un mécanisme encore inconnu. Pour étudier l'effet du knockdown de MDM2 sur la sensibilité de N-MLV à l'Arsenic, nous avons traité avec des doses croissantes d' As_2O_3 des TE671 transduites avec la banque de shRNA et le shRNA contre MDM2 puis les avons infectées avec N-MLV ou B-MLV exprimant GFP de façon à obtenir entre 0,5 % et 2 % de cellules infectées en absence de drogue. Dans les cellules contrôles transduites avec la banque, l' As_2O_3 augmente l'infektivité de N-MLV d'environ 13 fois et l'infektivité de B-MLV d'environ 2 fois, ce que nous considérons comme notre bruit de fond. Dans les cellules MDM2 knockdown (MDM2_{kd}), l'effet de l' As_2O_3 est deux fois moins important que dans les cellules contrôles (Fig. 4.7). Ceci est une preuve compatible avec l'hypothèse que l'effet antiviral de MDM2 dépend de TRIM5 α .

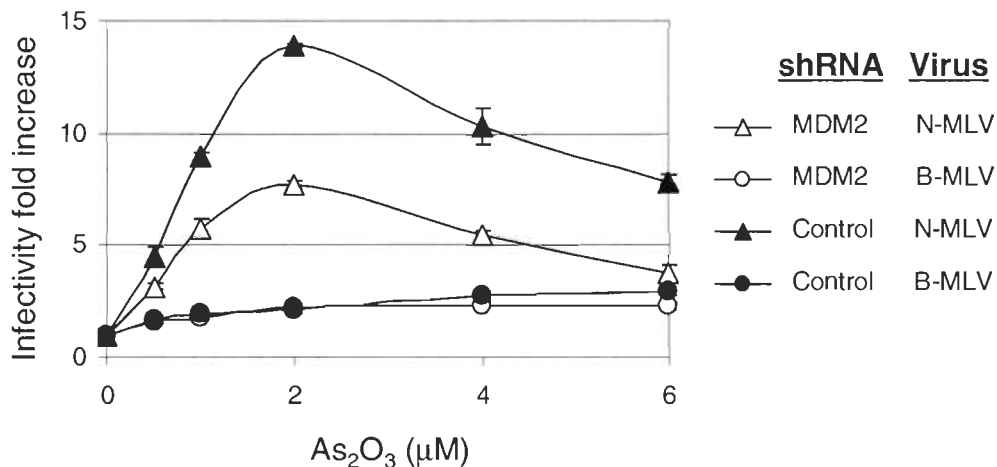


Figure 4.7 : Le knockdown de MDM2 diminue la sensibilité de N-MLV à l'arsenic. Les TE671 transduites avec l'ensemble de la banque comme contrôle ou le shRNA contre MDM2 furent traitées avec des doses croissantes d'arsenic puis infectées avec N ou B-MLV_{GFP}.

4.7 MDM2 agit sur l'accumulation de l'ADN complémentaire de N-MLV selon un mécanisme impliquant le protéasome

L'utilisation d'inhibiteurs du protéasome tel que MG132 permet de rétablir l'accumulation de l'ADN viral. Toutefois cette drogue a peu d'effet sur l'infectivité car elle n'affecte pas les autres mécanismes de restriction de TRIM5 α [48, 98].

MDM2, comme TRIM5 α , est une ubiquitine ligase. Nous avons donc souhaité déterminer si son effet sur la restriction par TRIM5 α dépendait du protéasome. Pour cela nous avons infecté les TE671 contrôles et les TE671 MDM2_{KD} avec les mêmes doses de N-MLV et B-MLV en présence ou non de MG132. Comme contrôle, nous avons traité les cellules avec l'AZT (azidothymidine), un inhibiteur de reverse transcription. Ensuite nous avons d'une part suivi l'infectivité des virus (Fig. 4.8A et B) et d'autre part analysé la synthèse de l'ADN complémentaire viral par PCR quantitative en temps réel (Fig. 4.8C et D). Comme dans les expériences précédentes, le knockdown de MDM2 augmente l'infectivité de N-MLV d'environ 3 à 4 fois. Dans les cellules contrôles, exprimant la banque de shRNA, MG132 augmente d'environ 3 fois la réplication de N-MLV mais n'a presque aucun effet dans les cellules MDM2_{kd} (Fig. 4.8A). Comme la réplication de B-MLV est légèrement augmentée par le knockdown de MDM2 et le traitement au MG132 nous avons présenté nos données sous forme de ratios d'infectivité de B-MLV/N-MLV dans les TE671 contrôles et MDM2_{kd} traitées ou non au MG132. Ceci montre que le traitement au MG132 et le knockdown de MDM2 réduisent la restriction de N-MLV de respectivement 2 et 3 fois. Par contre, MG132 n'a aucun effet sur la restriction du N-MLV dans les cellules MDM2_{KD} (Fig. 4.8B). Ceci montre clairement que d'une part le traitement au MG132 et le knockdown de MDM2 diminuent respectivement la restriction du N-MLV de 2 et 3 fois et que d'autre part le traitement au MG132 n'a que très peu d'effet dans les cellules MDM2_{KD}.

L'expression du shRNA contre MDM2 provoque une augmentation de l'ADNc de N-MLV d'environ deux fois (Fig. 4.8C et D). Comme d'autres équipes auparavant, nous observons que le traitement au MG132 permet de rétablir l'accumulation de l'ADN du N-MLV mais n'a presque aucun effet sur l'ADN du contrôle B-MLV qui n'est pas

soumis à restriction [47, 48] (Fig. 4.8C). Cet effet de MG132 observé dans les cellules contrôles est conservé dans les cellules MDM2_{KD} (Fig. 4.8D).

Ceci indique que l'effet antiviral de MDM2 sur N-MLV dépend de l'activité du protéasome. Néanmoins, le fait que l'effet de MG132 sur l'accumulation de l'ADNc de N-MLV, bien que plus faible, soit conservé dans les cellules MDM2_{KD} indique que d'autres mécanismes impliquant le protéasome jouent un rôle plus important dans la restriction des rétrovirus par TRIM5 α .

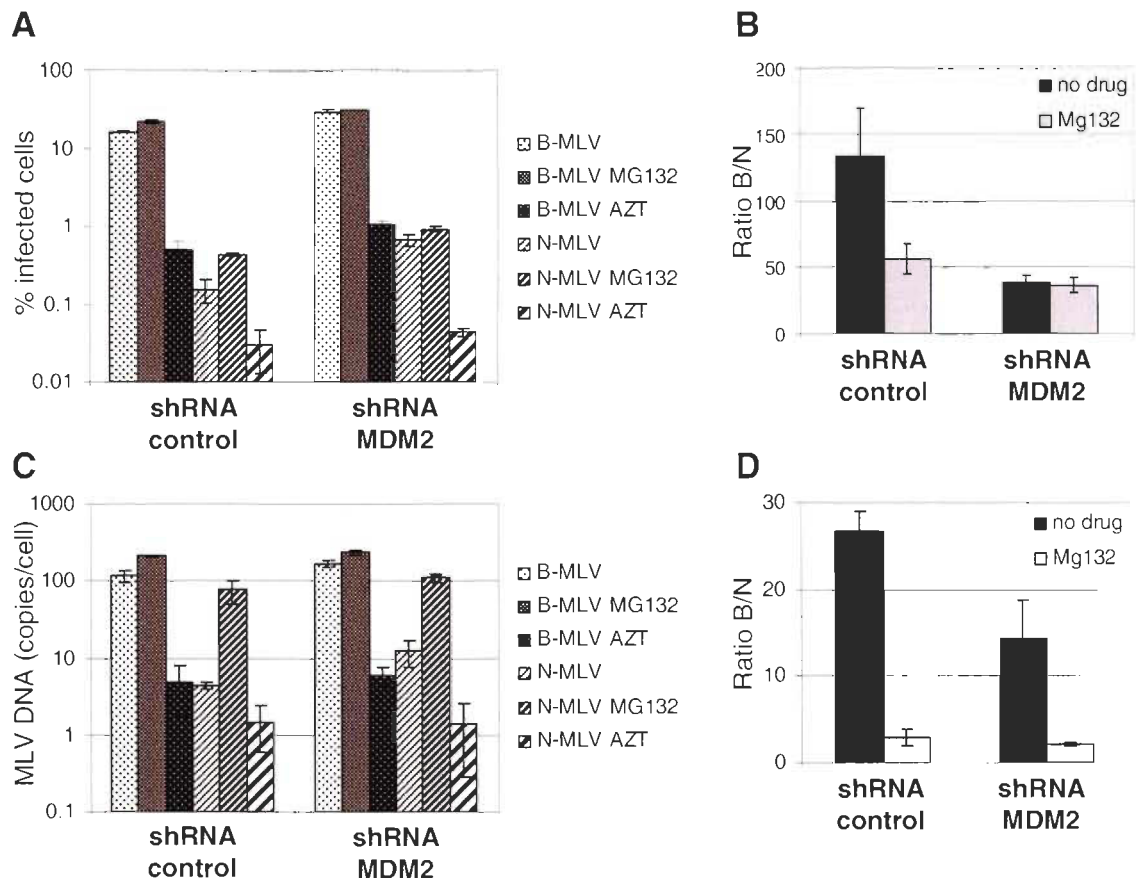


Figure 4.8 : MDM2 diminue l'accumulation de l'ADN viral selon un mécanisme impliquant le protéasome. **A)** Des TE671 exprimant le shRNA contre MDM2 ou la banque de shRNA comme contrôle furent infectées avec des doses équivalentes de N-MLV ou B-MLV exprimant GFP en présence ou absence de MG132 ou AZR. 3 jours après l'infectivité des virus fut mesurée par cytométrie de flux. **B)** Les données de la figure A sont représentées sous forme de ratio de l'infectivité de B-MLV sur l'infectivité de N-MLV. **C)** L'infection est réalisée comme décrit en A puis les ADN totaux des cellules extraits 12 h après infection. La synthèse de l'ADN viral fut quantifiée par PCR quantitative grâce à des amorces spécifiques de la GFP. **D)** Les données de la figure C sont représentées sous forme de ratio de l'infectivité de B-MLV sur l'infectivité de N-MLV.

4.8 Déterminer les domaines de MDM2 important pour la restriction

Afin de mieux caractériser le mécanisme d'action de MDM2, nous avons voulu étudier quels étaient les domaines de la protéine importants pour son activité anti-virale. Pour cela deux méthodes ont été utilisées : l'utilisation de drogues et l'expression de mutants de MDM2.

Deux drogues ont été utilisées : Nutlin3a et la sempervirine. Nutlin3a est un inhibiteur de liaison entre p53 et MDM2. Cet inhibiteur vient se fixer dans une poche hydrophobe présente à la surface de MDM2 au niveau du domaine de liaison avec p53. La Sempervirine est un inhibiteur de l'activité E3ubiquitine ligase de MDM2 [107]. D'après nos expériences préliminaires, aucune de ces deux drogues ne semble avoir d'effet sur l'activité antivirale de MDM2.

Comme les drogues ne donnaient pas de résultats, nous avons décidé de produire des vecteurs rétroviraux exprimant des mutants de MDM2. Ces vecteurs ont été réalisés grâce aux constructions du Dr Linda Harris (St Jude Hospital, Memphis) [108, 109]. Trois vecteurs expriment ainsi soit (Fig. 4.9) :

- MDM2 WT;
- MDM2 NLS qui possède une mutation KR vers NG au niveau du domaine NLS empêchant ainsi la localisation nucléaire de la protéine;
- MDM2 C438A dont la mutation ponctuelle de la cystéine 438 en Alanine empêche l'activité ubiquitine ligase de la protéine.

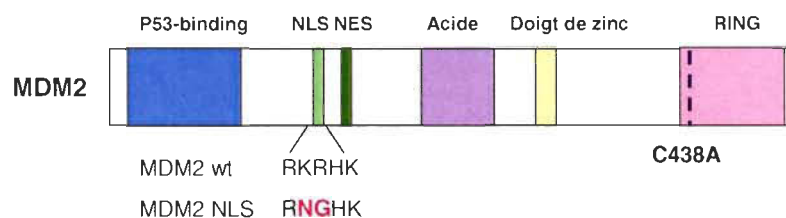


Figure 4.9 : Mutants de MDM2

Du fait de leur toxicité, ces mutants n'ont pu être exprimés de façon stable dans des TE671. Néanmoins ils l'ont été, grâce à des transfections, de façon transitoire. L'expérience décrite ci dessous a été réalisée après mon départ du laboratoire par le Dr Lionel Berthoux. Des cellules TE671 ont été cotransfectées avec 2 plasmides : l'un codant pour une des constructions de MDM2 et l'autre pour la RFP. La cotransfection avec la RFP permet de suivre les cellules transfectées et donc exprimant une protéine MDM2. Les cellules ont ensuite été infectées avec N-MLV_{GFP}. Afin de déterminer le profil de restriction des cellules transduites, le pourcentage de cellules infectées GFP+ parmi les cellules RFP+ a été analysé par cytométrie de flux. Aucun de ces mutants ne semble avoir d'effet sur la réplication de N-MLV. Ceci laisse envisager un lien indirect entre TRIM5 α et MDM2.

CHAPITRE 5

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

TRIM5 α est un facteur de restriction induit par les interférons de type 1 qui inhibe la réplication rétrovirale lors des phases précoces de l'infection. Si le mécanisme d'action de TRIM5 α sur le virus lui-même est plutôt bien caractérisé, peu de choses sont connues sur ses cofacteurs. Ainsi si la cyclophiline A est nécessaire à l'inhibition du VIH-1 par TRIM5 α dans certaines lignées cellulaires simiennes [94], elle semble protéger le virus dans les cellules humaines [95]. Il est également intéressant de constater que différentes lignées cellulaires comme les cellules 17H1 ne présentent pas de restriction alors que TRIM5 α est exprimé [96]. De même différents orthologues de TRIM5 α sont incapables d'inhiber le VIH-1 dans les cellules canines MDTF [41]. Toutes ces observations suggéraient donc l'existence de facteurs cellulaires inconnus impliqués dans l'activité de restriction de TRIM5 α .

L'objectif de ce projet consistait à isoler ces protéines cellulaires et élucider leur mécanisme d'action au niveau moléculaire. Pour cela un crible génétique par perte de fonction basé sur l'interférence à l'ARN a été réalisé et a permis d'identifier l'oncoprotéine MDM2 comme un modulateur de l'activité de TRIM5 α .

5.1 Raisons de la non exhaustivité du crible et shRNAs susceptibles d'être isolés

Notre crible, comme tout crible, n'est pas exhaustif et ne permet donc pas d'identifier tous les gènes codants pour des protéines importantes pour l'activité de Trim5 α . Ces biais, d'origines diverses peuvent être dû à la conception de la banque de shRNA, aux moyens techniques mis à notre disposition, à la nature et fonction des protéines inhibées ou encore à notre détection des positifs et négatifs.

- Il est possible qu'aucun shRNA de la banque ne soit efficace contre certains ARN messagers.

- Tous les shRNA n'ont pas forcément été transduits. Néanmoins dans notre cas cela semble peu probable vu la confluence d'environ 80% des cellules transduites après deux jours de traitement à la puromycine. De plus, certains clones expriment plus d'un shRNA comme les Clone52 et 59 qui en expriment respectivement 5 et 3.
- Certains shRNA candidats peuvent inhiber la transcription d'un gène dont le produit est indispensable à la survie de la cellule. Dans ce cas, il est possible de manquer un shRNA candidat puisque les cellules transduites ne peuvent survivre. Ce problème pourrait être contourné en utilisant un crible de siRNA et non un système de transduction stable.
- Certains shRNA candidats peuvent également "inhiber" un gène jouant un rôle dans la division cellulaire. En effet, le virus MLV n'infecte que les cellules en division (au contraire du VIH). Dès lors, même si un clone a perdu la restriction par Trim5 α , il ne sera que faiblement infecté par MLV et pourra de ce fait être manqué par le crible.
- Suite à l'infection des TE671 transduites par N-MLV_{GFP}, seules 192 cellules GFP positives sur 270000 ont été isolées dans 2 plaques 96 puits. Parmi les cellules GFP positives non isolées certaines pouvaient exprimer un shRNA candidat. De plus, parmi ces 192 clones, seuls 60 ont survécu et pu être infectés par B-MLV_{RFP} et N-MLV_{RFP}.

Lors du début de ce projet seul les interférons de type 1 qui régulent la transcription de TRIM5 α , la Cyclophiline A qui favorise son activité dans les cellules simiennes et le protéasome dont l'inhibition permet de rétablir l'accumulation des produits de reverse transcription étaient connus comme acteurs directs ou indirects de l'activité de restriction de TRIM5 α . Depuis, d'autres interactions ont été mis en évidence comme celles avec la protéine de choc thermique Hsp70 [99] ou le sequestosome-1/p62 [100], une protéine également induite par les interférons qui colocalise avec TRIM5 α au niveau des corps cytoplasmiques.

Parmi les 12 shRNAs d'intérêts, il n'aurait donc pas été surprenant d'avoir isolé, grâce au crible, des shRNA dirigés contre les interférons, des acteurs du protéasome ou des protéines de choc thermique. Si TRIM5 α , avait été présent dans notre banque de shRNA, nous aurions eu de grande chance de l'isoler, ce qui aurait été un contrôle parfait.

Comme la forme active de TRIM5 α semble être un multimère, des shRNA dirigés contre des protéines intervenant dans la multimérisation de TRIM5 α auraient pu être identifiés.

Il est également possible d'avoir isolé des shRNA dirigés contre des facteurs de restriction agissant indépendamment de Trim5 α . Cela aurait pu être le cas d'autres membres de la famille TRIM.

Un autre candidat de notre crible, la chaîne intermédiaire légère de la Dynein 1 DYNC1LI1, inhibé dans le clone 33 se révèle particulièrement intéressant. La Dynein fait partie des protéines de moteur qui permettent le transport des différentes cargaisons cellulaires le long des microtubules en hydrolysant l'ATP. Cette protéine est intéressante pour diverses raisons. D'une part, son knockdown provoque une augmentation de l'infectivité de N-MLV d'environ deux fois et d'autre part, elle revient dans la littérature traitant de VIH et de TRIM5 α . Ainsi, la Dyneine est utilisée par le VIH pour se déplacer le long des microtubules et migrer jusqu'au noyau [101, 102]. Elle colocalise également avec TRIM5 α au niveau des corps cytoplasmiques [103]. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détail le rôle de la Dynein sur la restriction de N-MLV par TRIM5 α .

5.2 La famille TRIM, une famille aux propriétés antirétrovirales?

Plusieurs membres de cette famille protéique possèdent des activités rétrovirales à large spectre ou spécifique des rétrovirus. Ainsi, Pradeep D.Uchil et al., suite à un crible, apportaient la preuve en 2008 que près de 20 protéines TRIM inhibaient différentes étapes, tardives ou précoces de la réplication du VIH et N-MLV [97].

- L'entrée du VIH est inhibée très efficacement par TRIM5 du macaque Rhésus (environ 38 fois) et moins efficacement par TRIM5 humain (environ 5 fois) [9, 10]. TRIM8 de souris inhibe aussi efficacement l'entrée du VIH que TRIM5 humain. De façon beaucoup plus modérée TRIM11, 26, 31 humains et TRIM10, 11 et 56 de souris inhibent également l'entrée du VIH [97]. Ainsi, aucun autre membre de la famille TRIM n'inhibe aussi efficacement l'entrée du VIH que TRIM5 α du macaque rhésus.
- L'entrée du N-MLV et non du B-MLV est fortement inhibée par TRIM5 et TRIM1 humains. TRIM25, 26, 62 humains et TRIM8, 25, 31 et 56 de souris inhibent plus modérément l'entrée des deux souches N et B du MLV. Au contraire TRIM11 humain et de souris augmente spécifiquement l'entrée du N-MLV d'environ 4 fois [97].
- TRIM15, 26, 32 et 19 humains inhiberaient le relargage de particules virales infectieuses du VIH [97].
- TRIM8, 15, 19, 26 et 28 humains inhiberaient le relargage de particules virales de N-MLV infectieuses alors que TRIM11, 13, 21, 27, 31, 32 et 62 inhiberaient la synthèse de protéines virales [97].

2 membres de cette famille nous intéressent plus particulièrement : il s'agit de TRIM19 et TRIM28, respectivement PML et Kap1, qui interagissent avec MDM2. TRIM19, constituant majoritaire des corps nucléaire PML, est connu depuis longtemps pour son activité antivirale à large spectre. Il inhibe la réplication du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), du virus InfluenzaA, du cytomégalo virus humain, de l'herpès simplex de type 1, des foamy virus humain et le virus Ebola [104, 105].

TRIM28, le co-récepteur nucléaire Kap1 est connu pour inhiber la transcription du LTR de MLV dans les cellules d'origines germinales. De plus, Kap1 contrôle les rétrovirus endogènes murin lors du développement embryonnaire [97].

5.3 Vers le mécanisme de MDM2 dans la restriction de N-MLV

Le knockdown de MDM2 diminue la restriction de N-MLV et EIAV par TRIM5 α_{hu} dans les cellules humaines. Quang Toan Pham et Mélodie B. Plourde du laboratoire ont également étudié l'effet du knockdown de MDM2 dans des cellules Vero de singes verts africains. Dans ces cellules TRIM5 α_{agm} inhibe la réplication du VIH-1 et de N-MLV par plus de 10 fois [60, 94]. Suite au knockdown de MDM2 grâce à des shRNA spécifiques de MDM2 de macaque (il n'existe pas de données sur la séquence de MDM2 du singe vert africain) ils ont observé dans les cellules Vero, une diminution de la restriction du VIH-1 d'environ 4 fois et de N-MLV d'environ 2 fois (cf. Annexe 4 : Fig. 4) [106]. MDM2 module donc l'activité de restriction de TRIM5 α à la fois dans les cellules humaines et simiennes et est aussi bien actif contre le EIAV, le N-MLV ou le VIH-1. Néanmoins, bien que l'effet de MDM2 soit significatif il reste toute fois modeste.

Des expériences réalisées par Quang Toan Pham sur des lymphocytes B de poulet DT40 Knock-out pour MDM2 puis transduites avec TRIM5 α_{hu} montrent que MDM2 n'est pas indispensable à l'activité de restriction de TRIM5 α (cf. Annexe 4 : Fig. 5A et B). Quang Toan Pham a également montré que le knockdown de MDM2 n'avait pas d'effet sur la restriction lorsque TRIM5 α était surexprimé dans les cellules. (cf. Annexe 4 : Fig. 5C) L'activité de MDM2 semble donc dépendre du niveau d'expression de TRIM5 α . MDM2 pourrait ainsi être, en plus de l'interféron, un facteur de transcription de TRIM5 α . Néanmoins les résultats préliminaires de quantification de l'ARNm de TRIM5 α dans les cellules contrôles et MDM2 $_{kd}$ ne semblent pas aller en ce sens.

MDM2 est une ubiquitine ligase responsable de sa propre ubiquitination ainsi que de celle de p53. Elle interagit également avec de nombreuses protéines régulatrices de p53, dont deux appartiennent à la famille TRIM : TRIM28 (Kap1) et TRIM19 (PML).

L'interaction entre MDM2 et le corépresseur nucléaire Kap1 se produit entre les régions Coiled-Coil de Kap1 et la région centrale acide de MDM2. La délétion du domaine RING de Kap1 altère fortement la liaison des deux protéines. L'interaction entre KAP-1 et MDM2 inhibe l'acétylation de p53 et stimule son ubiquitination [74].

Les domaines RING de PML et MDM2 sont nécessaires à la déstabilisation des corps nucléaires de PML et à la redistribution de PML dans le cytoplasme par MDM2. De plus, le domaine acide de la région centrale de MDM2 peut se lier à la région C terminale de PML qui inclue une partie du domaine Coiled-Coil. Ainsi, les domaines acide et RING de MDM2 interagissent respectivement avec les régions Coiled-coil et RING de deux membres de la famille TRIM [76]. Par homologie, on peut supposer que si une interaction entre MDM2 et TRIM5 existe, celle-ci interviendrait entre ces mêmes domaines.

L'infection par un virus soumis à restriction provoque la dégradation accélérée de TRIM5 α par le protéasome [47]. De plus, l'inhibition du protéasome permet de rétablir l'accumulation des produits de reverse transcription sans toutefois abolir la restriction ni restaurer la formation des cercles à 2 LTR. TRIM5 α préviendrait donc la migration du complexe de reverse transcription jusqu'au noyau [48, 98].

D'après nos résultats, MDM2 interviendrait avant ou pendant les étapes de reverse transcription suivant un mécanisme impliquant le protéasome. En outre, bien qu'il n'existe aucune preuve de l'ubiquitination de la capsid virale durant le mécanisme de restriction, le fait que TRIM5 α soit ubiquitiné *in vivo* et que la délétion du domaine RING, indispensable à l'ubiquitination de TRIM5 α [103], altère la restriction laisse supposer qu'un complexe [TRIM5 α ubiquitiné – Capsid virale] pourrait être dégradé par le protéasome. Enfin, il a récemment été rapporté que TRIM5 α en plus de pouvoir s'auto-ubiquitiner pouvait être ubiquitiné *in vivo* par TRIM 21 (ou Ro52) [28].

Toutes ces observations corrélées à nos résultats suggèrent que MDM2 via la fonction ubiquitine ligase que lui confère son domaine RING, pourrait participer à

l'ubiquitination de TRIM5 α et donc favoriser sa dégradation par le protéasome. Pour tester cette hypothèse, Marie-Edith Nepveu-Traversy, étudiante en thèse au laboratoire a tenté de détecter les formes ubiquitinées de TRIM5 α et leur modulation par MDM2. Pour cela HA-ubiquitine, TRIM5 α_{RH} et différents mutants de MDM2 ont été co-transfectés dans des cellules 293T. Si l'expérience n'a pas permis de détecter les formes ubiquitinées de TRIM5 α , elle a permis une observation intéressante sur les niveaux de la protéine. Ainsi l'expression de MDM2 WT et MDM2 NLS (mutant incapable de se lier à l'ADN) augmente le niveau de TRIM5 α alors que l'expression de MDM2 CA (mutant ayant perdu son activité ubiquitine ligase) n'a aucun effet. Ainsi MDM2 semble stabiliser TRIM5 α , probablement en ciblant une protéine capable d'ubiquitiner et de dégrader TRIM5 α . Cette expérience préliminaire devra être recommencée en présence ou non de l'inhibiteur de protéasome MG132 ainsi que suite à l'infection par un virus soumis à restriction.

5.4 Conclusion et perspectives

Les objectifs de ma maîtrise, c'est-à-dire identifier des protéines cellulaires impliquées dans l'activité de restriction de TRIM5 α et élucider leur mécanismes, ont été partiellement atteints. Le crible génétique a permis d'identifier l'oncoprotéine MDM2 comme un nouveau modulateur de l'activité de restriction de TRIM5 α . Ainsi, le knockdown de MDM2 provoque une augmentation de l'infectivité du N-MLV, EIAV et VIH-1. Les expériences de double knockdown de TRIM5 α et MDM2 ainsi que le traitement avec l'arsenic trioxyde démontrent que l'activité anti-rétrovirale de MDM2 dépend de l'activité de TRIM5 α . Enfin, les expériences de PCR quantitative de l'ADN viral après traitement avec un inhibiteur du protéasome, le MG132, nous ont permis de déterminer que MDM2 diminuait l'accumulation de l'ADN viral selon un mécanisme dépendant du protéasome. Notre première hypothèse était que MDM2 via sa fonction ubiquitine ligase conférée par son domaine RING, pourrait participer à l'ubiquitination de TRIM5 α et donc favoriser sa dégradation par le protéasome. Or, des expériences préliminaires montrant que MDM2 WT, mais non le mutant ayant perdu son activité ubiquitine ligase, augmente le niveau de TRIM5 α sont plus en faveur d'un lien indirect

entre MDM2 et TRIM5 α . Ainsi, MDM2 pourrait stabiliser TRIM5 α en ciblant une protéine capable d'ubiquitiner et de dégrader TRIM5 α .

Grâce à ces travaux, MDM2 rallonge la courte liste des cofacteurs de TRIM5 α et son étude devrait permettre de découvrir d'autres acteurs de la restriction et notamment des ubiquitine ligases de TRIM5 α .

BIBLIOGRAPHIE

1. Charmetant : **Etude fonctionnelle et structurale de la protéine intégrase des retrovirus et application en transgène**. Ecole pratique des hautes études sciences de la vie et de la terre, 2005; 2005.
2. Goujon C : **Caractérisation des fonctions de la protéine vpx dans l'infection lentivirale des cellules dendritiques humaines**. Ecole Normale Supérieure de Lyon, 2007.
3. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, Honore N, Doubeikovsky A, Duprez E, Pandolfi PP, Puvion E, Freemont P, de Thé H: **Role of promyelocytic leukemia (PML) sumoylation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation**. *J Exp Med* 2001, **193**:1361-1371.
4. **HIV Life Cycle** [<http://www.nwabr.org/education/hivrequest.html>]
5. Bieniasz PD: **Restriction factors: a defense against retroviral infection**. 2003, **11**:286-291.
6. DesGroseillers L, Jolicoeur P: **Physical mapping of the Fv-1 tropism host range determinant of BALB/c murine leukemia viruses**. *J Virol* 1983, **48**:685-696.
7. DesGroseillers L, Jolicoeur P: **Mapping the viral sequences conferring leukemogenicity and disease specificity in Moloney and amphotropic murine leukemia viruses**. *J Virol* 1984, **52**:448-456.
8. Besnier C, Ylinen L, Strange B, Lister A, Takeuchi Y, Goff SP, Towers GJ: **Characterization of murine leukemia virus restriction in mammals**. *J Virol* 2003, **77**:13403-13406.
9. Hatzioannou T, Perez-Caballero D, Yang A, Cowan S, Bieniasz PD: **Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5 α** . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**:10774-10779.

10. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J: **The cytoplasmic body component TRIM5[alpha] restricts HIV-1 infection in Old World monkeys.** *Nature* 2004, **427**:848-853.
11. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH: **Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein.** *Nature* 2002, **418**:646-650.
12. Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L: **The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA.** *Nature* 2003, **424**:94-98.
13. Kao S, Khan MA, Miyagi E, Plishka R, Buckler-White A, Strebel K: **The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Reduces Intracellular Expression and Inhibits Packaging of APOBEC3G (CEM15), a Cellular Inhibitor of Virus Infectivity.** *J Virol* 2003, **77**:11398-11407.
14. Zennou V, Perez-Caballero D, Gottlinger H, Bieniasz PD: **APOBEC3G Incorporation into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles.** *J Virol* 2004, **78**:12058-12061.
15. Stopak K, de Noronha C, Yonemoto W, Greene WC: **HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability.** *Mol Cell* 2003, **12**:591-601.
16. **APOBEC3G antiviral activity and mechanism of counteraction by HIV-1 Vif** [http://home.ncifcrf.gov/hivdrp/Pathak_figure1.html]
17. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD: **Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu.** *Nature* 2008, **451**:425-430.
18. Hammonds J, Spearman P: **Tetherin Is as Tetherin Does.** 2009, **139**:456-457.
19. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD: **Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu.** *Nature* 2008, **451**:425-430.
20. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, Bieniasz PD: **Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells.** 2009, **139**:499-511.

21. Mitchell RS, Katsura C, Skasko MA, Fitzpatrick K, Lau D, Ruiz A, Stephens EB, Margottin-Goguet F, Benarous R, Guatelli JC: **Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000450.
22. Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, Piguet V: **HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000574.
23. Gottlinger HG: **HIV/AIDS: Virus kept on a leash.** *Nature* 2008, **451**:406-408.
24. Towers G: **The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A.** *Retrovirology* 2007, **4**:40.
25. Mische CC, Javanbakht H, Song B, Diaz-Griffero F, Stremlau M, Strack B, Si Z, Sodroski J: **Retroviral Restriction Factor TRIM5{alpha} Is a Trimer.** *J Virol* 2005, **79**:14446-14450.
26. Nepveu-Traversy M-E, Berube J, Berthoux L: **TRIM5alpha and TRIMCyp form apparent hexamers and their multimeric state is not affected by exposure to restriction-sensitive viruses or by treatment with pharmacological inhibitors.** *Retrovirology* 2009, **6**:100.
27. Mische C, Javanbakht H, Song B, Diaz-Griffero F, Stremlau M, Strack B, Si Z, Sodroski J: **Retroviral restriction factor TRIM5alpha is a trimer.** *J Virol* 2005, **79**:14446 - 14450.
28. Yamauchi K, Wada K, Tanji K, Tanaka M, Kamitani T: **Ubiquitination of E3 ubiquitin ligase TRIM5 alpha and its potential role.** *FEBS Journal* 2008, **275**:1540-1555.
29. Diaz-Griffero F, Li X, Javanbakht H, Song B, Welikala S, Stremlau M, Sodroski J: **Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5.** *Virology* 2006, **349**:300-315.
30. Song B, Gold B, O'HUigin C, Javanbakht H, Li X, Stremlau M, Winkler C, Dean M, Sodroski J: **The B30.2(SPRY) Domain of the Retroviral Restriction Factor TRIM5{alpha} Exhibits Lineage-Specific Length and Sequence Variation in Primates.** In *J Virol*, vol. 79. pp. 6111-6121; 2005:6111-6121.

31. Yap MW, Nisole S, Stoye JP: **A Single Amino Acid Change in the SPRY Domain of Human Trim5[alpha] Leads to HIV-1 Restriction.** *Current Biology* 2005, **15**:73-78.
32. Maegawa H, Miyamoto T, Sakuragi J, Shioda T, Nakayama EE: **Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5alpha depends on combination of host and virus.** *Virology*, **399**:212-220.
33. Stremlau M, Perron M, Welikala S, Sodroski J: **Species-Specific Variation in the B30.2(SPRY) Domain of TRIM5{alpha} Determines the Potency of Human Immunodeficiency Virus Restriction.** *J Virol* 2005, **79**:3139-3145.
34. Newman RM, Hall L, Kirmaier A, Pozzi LA, Pery E, Farzan M, O'Neil SP, Johnson W: **Evolution of a TRIM5-CypA splice isoform in old world monkeys.** *PLoS Pathog* 2008, **4**:e1000003.
35. Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J: **Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1.** *Nature* 2004, **430**:569-573.
36. Liao CH, Kuang YQ, Liu HL, Zheng YT, Su B: **A novel fusion gene, TRIM5-Cyclophilin A in the pig-tailed macaque determines its susceptibility to HIV-1 infection.** *Aids* 2007, **21** Suppl 8:S19-26.
37. Schaller T, Hue S, Towers GJ: **An Active TRIM5 Protein in Rabbits Indicates a Common Antiviral Ancestor for Mammalian TRIM5 Proteins.** *J Virol* 2007, **81**:11713-11721.
38. Si Z, Vandegraaff N, O'HUigin C, Song B, Yuan W, Xu C, Perron M, Li X, Marasco WA, Engelman A, et al: **Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, **103**:7454-7459.
39. Strebel K LJ, Jeang KT: **Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication.** *BMC Med* 2009, **16**:48.
40. Perron MJ, Stremlau M, Lee M, Javanbakht H, Song B, Sodroski J: **The Human TRIM5{alpha} Restriction Factor Mediates Accelerated Uncoating of the N-Tropic Murine Leukemia Virus Capsid.** *J Virol* 2007, **81**:2138-2148.

41. Bérubé J, Bouchard A, Berthouix L: **Both TRIM5alpha and TRIMCyp have only weak antiviral activity in canine D17 cells.** *Retrovirology* 2007, **4**:68.
42. Perron MJ, Stremlau M, Lee M, Javanbakht H, Song B, Sodroski J: **The human TRIM5alpha restriction factor mediates accelerated uncoating of the N-tropic murine leukemia virus capsid.** *J Virol* 2007, **81**:2138-2148.
43. Perron MJ, Stremlau M, Song B, Ulm W, Mulligan RC, Sodroski J: **TRIM5alpha mediates the postentry block to N-tropic murine leukemia viruses in human cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:11827-11832.
44. Yap MW, Nisole S, Lynch C, Stoye JP: **Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:10786-10791.
45. Chatterji U, Bobardt MD, Gaskill P, Sheeter D, Fox H, Galloway PA: **Trim5alpha accelerates degradation of cytosolic capsid associated with productive HIV-1 entry.** *J Biol Chem* 2006, **281**:37025-37033.
46. Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H, Diaz-Griffero F, Anderson DJ, Sundquist WI, Sodroski J: **Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:5514-5519.
47. Rold CJ, Aiken C: **Proteasomal Degradation of TRIM5α during Retrovirus Restriction.** *PLoS Pathogens* 2008, **4**:e1000074.
48. Anderson JL, Campbell EM, Wu X, Vandegraaff N, Engelman A, Hope TJ: **Proteasome Inhibition Reveals that a Functional Preintegration Complex Intermediate Can Be Generated during Restriction by Diverse TRIM5 Proteins.** *J Virol* 2006, **80**:9754-9760.
49. Wu X, Anderson JL, Campbell EM, Joseph AM, Hope TJ: **Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5{alpha} restriction of HIV-1 reverse transcription and infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, **103**:7465-7470.
50. Campbell EM, Dodding MP, Yap MW, Wu X, Gallois-Montbrun S, Malim MH, Stoye JP, Hope TJ: **TRIM5{alpha} Cytoplasmic Bodies Are Highly Dynamic Structures.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**:2102-2111.

51. Campbell EM, Perez O, Anderson JL, Hope TJ: **Visualization of a proteasome-independent intermediate during restriction of HIV-1 by rhesus TRIM5 α** . *J Cell Biol* 2008, **180**:549-561.
52. Sawyer SL, Emerman M, Malik HS: **Discordant Evolution of the Adjacent Antiretroviral Genes *TRIM22* and *TRIM5* in Mammals**. *PLoS Pathog* 2007, **3**:e197.
53. Barr SD, Smiley JR, Bushman FD: **The Interferon Response Inhibits HIV Particle Production by Induction of TRIM22**. *PLoS Pathog* 2008, **4**:e1000007.
54. Obad S, Olofsson T, Mechti N, Gullberg U, Drott K: **Regulation of the Interferon-Inducible p53 Target Gene TRIM22 (Staf50) in Human T Lymphocyte Activation**. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2007, **27**:857-864.
55. Asaoka K, Ikeda K, Hishinuma T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S: **A retrovirus restriction factor TRIM5 α is transcriptionally regulated by interferons**. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **338**:1950-1956.
56. Carthagen L, Parise MC, Ringard M, Chelbi-Alix MK, Hazan U, Nisole S: **Implication of TRIM α and TRIMCyp in interferon-induced anti-retroviral restriction activities**. *Retrovirology* 2008, **5**:59.
57. Sakuma R, Mael AA, Ikeda Y: **Alpha interferon enhances TRIM5 α -mediated antiviral activities in human and rhesus monkey cells**. *J Virol* 2007, **81**:10201-10206.
58. Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, Jin XL, Tang W, Li XS, Xong SM, et al: **In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins**. *Blood* 1996, **88**:1052-1061.
59. Berthoux L, Towers GJ, Gurer C, Salomoni P, Pandolfi PP, Luban J: **As₂O₃ Enhances Retroviral Reverse Transcription and Counteracts Ref1 Antiviral Activity**. *J Virol* 2003, **77**:3167-3180.

60. Sebastian S, Sokolskaja E, Luban J: **Arsenic Counteracts Human Immunodeficiency Virus Type 1 Restriction by Various TRIM5 Orthologues in a Cell Type-Dependent Manner.** *J Virol* 2006, **80**:2051-2054.
61. Yoo S, Myszka DG, Yeh C-y, McMurray M, Hill CP, Sundquist WI: **Molecular recognition in the HIV-1 capsid/cyclophilin A complex.** *Journal of Molecular Biology* 1997, **269**:780-795.
62. Gamble TR, Vajdos FF, Yoo S, Worthylake DK, Houseweart M, Sundquist WI, Hill CP: **Crystal Structure of Human Cyclophilin A Bound to the Amino-Terminal Domain of HIV-1 Capsid.** *Cell* 1996, **87**:1285-1294.
63. Franke EK, Luban J: **Inhibition of HIV-1 Replication by Cyclosporine A or Related Compounds Correlates with the Ability to Disrupt the Gag-Cyclophilin A Interaction.** *Virology* 1996, **222**:279-282.
64. Berthoux L, Sebastian S, Sokolskaja E, Luban J: **Cyclophilin A is required for TRIM5{alpha}-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:14849-14853.
65. Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J: **Cyclophilin A and TRIM5alpha independently regulate human immunodeficiency virus type 1 infectivity in human cells.** *J Virol* 2006, **80**:2855-2862.
66. Vassilev LT: **MDM2 inhibitors for cancer therapy.** *Trends in Molecular Medicine* 2007, **13**:23-31.
67. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, et al: **In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2.** *Science* 2004, **303**:844-848.
68. Kim K, Burghardt RC, Barhoumi R, Lee S-O, Liu X, Safe S: **Mdm2 Regulates Estrogen Receptor {alpha} and Estrogen-responsiveness in Breast Cancer Cells.** *J Mol Endocrinol* 2010:JME-10-0110.
69. Hsu H-S, Chen H-W, Kao C-L, Wu M-L, Li A, Cheng T-H: **MDM2 is Overexpressed and Regulated by the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) in Human Squamous Cell Carcinoma of Esophagus.** *Annals of Surgical Oncology* 2010:1-9.

70. Takahashi K, Miyashita M, Makino H, Akagi I, Orita H, Hagiwara N, Nomura T, Gabrielson EW, Tajiri T: **Expression of Akt and Mdm2 in human esophageal squamous cell carcinoma.** *Experimental and Molecular Pathology* 2009, **87**:42-47.
71. Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, Rauscher FJ: **KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain.** *Genes & Development* 1996, **10**:2067-2078.
72. Schultz DC, Friedman JR, Rauscher FJ: **Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2/ϵ subunit of NuRD.** *Genes & Development* 2001, **15**:428-443.
73. Underhill C, Qutob MS, Yee S-P, Torchia J: **A Novel Nuclear Receptor Corepressor Complex, N-CoR, Contains Components of the Mammalian SWI/SNF Complex and the Corepressor KAP-1.** *Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**:40463-40470.
74. Chuangui Wang AI, Lihong Chen, William J Fredericks, Ed Seto, Frank J Rauscher III and Jiandong Chen: **MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation.** *The EMBO Journal* 2005, **24**:3279-3290.
75. Okamoto K, Kitabayashi I, Taya Y: **KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, **351**:216-222.
76. Bernardi R, Scaglioni PP, Bergmann S, Horn HF, Vousden KH, Pandolfi PP: **PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:665-672.
77. Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, et al: **MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif.** *Retrovirology* 2009, **6**:1.
78. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R: **Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans.** *Plant Cell* 1990, **2**:279-289.

79. Jorgensen R: **Plants, RNAi, and the Nobel Prize.** *Science* 2006, **314**:1242-1243.
80. Jorgensen RA: **Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression States.** *Science* 1995, **268**:686-691.
81. Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA: **Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences.** *Plant Mol Biol* 1996, **31**:957-973.
82. Guo S, Kemphues KJ: **Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo.** *Curr Opin Genet Dev* 1996, **6**:408-415.
83. Guo S, Kemphues KJ: **A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1996, **382**:455-458.
84. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998, **391**:806-811.
85. Sharp PA: **RNAi and double-strand RNA.** *Genes Dev* 1999, **13**:139-141.
86. Carthew RW: **Gene silencing by double-stranded RNA.** *Curr Opin Cell Biol* 2001, **13**:244-248.
87. Jinek M, Doudna JA: **A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference.** *Nature* 2009, **457**:405-412.
88. Siomi H, Siomi MC: **On the road to reading the RNA-interference code.** *Nature* 2009, **457**:396-404.
89. Mitrophanous K A YS, Rohll J B , Patil D , J Wilkes F , Kim V N , Kingsman S M , Kingsman A J and Mazarakis N D **Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector.** *Gene Therapy* 1999, **6**:1808-1818.

90. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D: **In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.** *Science* 1996, **272**:263-267.
91. Sakuma R, Mael AA, Ikeda Y: **Alpha Interferon Enhances TRIM5{alpha}-Mediated Antiviral Activities in Human and Rhesus Monkey Cells.** *J Virol* 2007, **81**:10201-10206.
92. Carthagen L, Parise M, Ringard M, Chelbi-Alix M, Hazan U, Nisole S: **Implication of TRIMalpha and TRIMCyp in interferon-induced anti-retroviral restriction activities.** *Retrovirology* 2008, **5**:59.
93. Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H, Diaz-Griffero F, Anderson DJ, Sundquist WI, Sodroski J: **From the Cover: Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5{alpha} restriction factor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, **103**:5514-5519.
94. Berthoux L, Sebastian S, Sokolskaja E, Luban J: **Cyclophilin A is required for TRIM5{alpha}-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005, **102**:14849-14853.
95. Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J: **Cyclophilin A and TRIM5{alpha} Independently Regulate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity in Human Cells.** *J Virol* 2006, **80**:2855-2862.
96. Sayah DM, Luban J: **Selection for Loss of Ref1 Activity in Human Cells Releases Human Immunodeficiency Virus Type 1 from Cyclophilin A Dependence during Infection.** *J Virol* 2004, **78**:12066-12070.
97. Uchil PD, Quinlan BD, Chan WT, Luna JM, Mothes W: **TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle.** *PLoS Pathog* 2008, **4**:e16.
98. Wu X, Anderson JL, Campbell EM, Joseph AM, Hope TJ: **Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:7465-7470.

99. Hwang CY, Holl J, Rajan D, Lee Y, Kim S, Um M, Kwon KS, Song B: **Hsp70 interacts with the retroviral restriction factor TRIM5alpha and assists the folding of TRIM5alpha.** *J Biol Chem*, **285**:7827-7837.
100. O'Connor C, Pertel T, Gray S, Robia SL, Bakowska JC, Luban J, Campbell EM: **p62/sequestosome-1 associates with and sustains the expression of retroviral restriction factor TRIM5alpha.** *J Virol*, **84**:5997-6006.
101. Fontenot DR, den Hollander P, Vela EM, Newman R, Sastry JK, Kumar R: **Dynein light chain 1 peptide inhibits human immunodeficiency virus infection in eukaryotic cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **363**:901-907.
102. Lehmann M, Milev MP, Abrahamyan L, Yao XJ, Pante N, Mouland AJ: **Intracellular transport of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and viral production are dependent on dynein motor function and late endosome positioning.** *J Biol Chem* 2009, **284**:14572-14585.
103. Diaz-Griffero F, Li X, Javanbakht H, Song B, Welikala S, Stremlau M, Sodroski J: **Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5.** *Virology* 2006, **349**:300-315.
104. Bjorndal AS, Szekely L, Elgh F: **Ebola virus infection inversely correlates with the overall expression levels of promyelocytic leukaemia (PML) protein in cultured cells.** *BMC Microbiol* 2003, **3**:6.
105. McNally BA, Trgovcich J, Maul GG, Liu Y, Zheng P: **A role for cytoplasmic PML in cellular resistance to viral infection.** *PLoS One* 2008, **3**:e2277.
106. Malbec M, Pham QT, Plourde MB, L'Etourneau-Hogan A, Nepveu-Traversy M-d, Berthoux L: **Murine double minute 2 as a modulator of retroviral restrictions mediated by TRIM5[alpha].** *Virology* 2010, **405**:414-423.
107. Sasiela CA, Stewart DH, Kitagaki J, Safiran YJ, Yang Y, Weissman AM, Oberoi P, Davydov IV, Goncharova E, Beutler JA, et al: **Identification of inhibitors for MDM2 ubiquitin ligase activity from natural product extracts by a novel high-throughput electrochemiluminescent screen.** *J Biomol Screen* 2008, **13**:229-237.

108. Harris LC: **MDM2 splice variants and their therapeutic implications.** *Curr Cancer Drug Targets* 2005, **5**:21-26.
109. Bartel F, Harris LC, Wurl P, Taubert H: **MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides.** *Mol Cancer Res* 2004, **2**:29-35.

ANNEXES

ANNEXE 1

Description du plasmide PSIH1-H1-puro

Le plasmide pSIH1-H1-Puro est un vecteur rétroviral de 7,048 bp dérivé du VIH-1. Ce vecteur comporte les LTR (long terminal repeat) 3' et 5' du VIH.

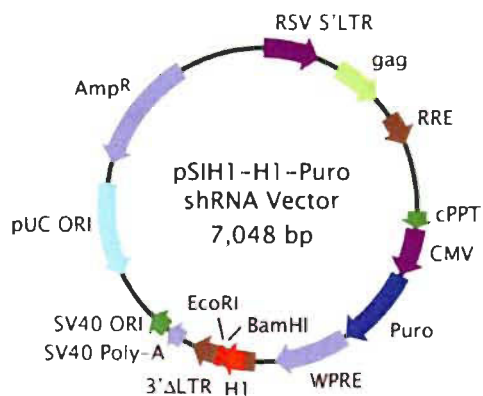
La région U3 du LTR 5' est remplacé par le promoteur RSV (Rous Sarcoma Virus) qui permet de produire l'ARN vecteur pour ensuite être rétrotranscrit en ADN proviral qui s'intégrera dans le génome de la cellule hôte.

Ce plasmide comporte également une cassette de résistance à la puromycine placée sous le contrôle du promoteur CMV (cytomégalovirus) permettant la sélection de cellules transduites.

La séquence d'une centaine de nucléotides codant pour le shRNA est insérée entre les deux sites de restriction uniques BamHI et EcoRI. Elle est placée sous le contrôle du promoteur H1 de l'ARN polymérase III.

Le LTR5' est tronqué de sa séquence U3. Cette délétion sera dupliquée dans chaque LTR au cours de la reverse transcription provoquant l'inactivation transcriptionnelle des gènes viraux placés sous le contrôle des LTR. Ceci permet de limiter le risque de formation de particules virales répliquatives. Ainsi, seul le gène de résistance à la puromycine et le shRNA placés sous le contrôle de promoteurs interne seront exprimés dans les cellules transduites.

Le plasmide pSIH1-H1-puro, possède également une cassette de résistance à l'ampicilline, permettant ainsi la sélection de bactéries transformées.



Carte du plasmide pSIH1-H1-Puro

Les localisations, lorsque aucun shRNA n'est inséré entre BamHI et EcoRI, des différents domaines et sites de restriction utilisés lors de l'étude sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Domaines	Localisation
CMV/5'LTR	1- 415
Promoteur CMV	1922-2271
Puro	2279-2878
3' ΔLTR (ΔU3)	3564-4038
Promoter H1 RNA	3602-3818
KpnI	3497
BamHI	3819
EcoRI	3828

ANNEXE 2

Création de la cassette d'expression du shRNA dans le vecteur pSIH1-H1

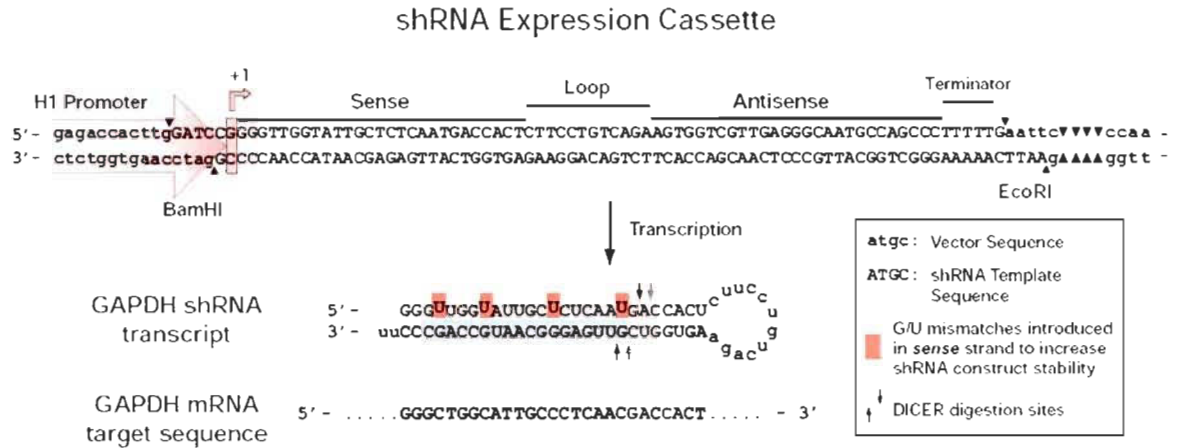


Fig. 10. Design of the shRNA expression cassette. The shRNA template sequence is cloned into the shRNA expression cassette which is the same for both pSIF1-H1 and pSIH1-H1 cloning vectors. siRNA template sequences are designed to be directionally inserted between the BamHI and EcoRI nucleotide overhangs (*i.e.*, sticky ends).

The nucleotides for the specific siRNA sequence are shown in capital letters. The siRNA sense and antisense sequences flank the region coding for the loop structure. In addition, a terminator sequence for the RNA polymerase III is included after the antisense portion. After transcription, a stem-loop-stem siRNA molecule is produced. This molecule is processed by the Dicer enzyme to generate a double-stranded siRNA effector.

▼▼▼▼ – polymorphic site with 3 sequences (ATGA, GTCA, or AGTT in the top strand) complementary to sublibrary-specific primers NRev GNF1/GNH1, GNF2/GNH2, and GNF3/GNH3, respectively.

ANNEXE 3

Composition des solutions

Tampon RIPA

- 150mM NaCl
- 1% NP-40
- 0,5% DOC
- 0,1% SDS
- 50mM TRIS pH 8,0

Laemmli

- 0,3M Tris
- 50% glycérol
- 10% SDS
- 5% mercaptoethanol
- 0,01% bleu de bromophenol

TBS Tween

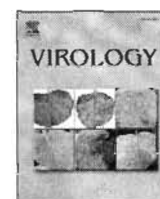
- 20mM Tris
- 150mM NaCl
- 0,1% Tween 20

ANNEXE 4

Murine double minute 2 as a modulator of retroviral restrictions mediated by TRIM5 α

Malbec M, Pham QT, Plourde MB, L'Etourneau-Hogan A, Nepveu-Traversy M-d,
Berthoux L

Virology 2010, **405**:414-423



Murine double minute 2 as a modulator of retroviral restrictions mediated by TRIM5 α

Marine Malbec¹, Quang Toan Pham, Mélodie B. Plourde, Alexandra Létourneau-Hogan, Marie-Édith Nepveu-Traversy, Lionel Berthoux^{*}

Laboratory of retrovirology, University of Québec, 3351 Boulevard des Forges, CP500, Trois-Rivières, Quebec, Canada G9A 5H7

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2010

Returned to author for revision

15 March 2010

Accepted 9 June 2010

Available online 8 July 2010

Keywords:

MLV

EIAV

HIV

TRIM5 α

Restriction

Proteasome

MDM2

RNAi

Genetic screen

ABSTRACT

In human cells, endogenous TRIM5 α strongly inhibits N-tropic strains of murine leukemia virus (N-MLV) but does not target the closely related B-MLV. We have used a shRNA-based loss-of-function screen to isolate factors other than TRIM5 α involved in the restriction of N-MLV. In one of the isolated clones, the shRNA expressed was found to target the murine double minute-2 mRNA. Knocking down MDM2 increased N-MLV and EIAV infection of human cells by 2- to 5-fold while having little effect on B-MLV. Similarly, knocking down MDM2 in African green monkey cells diminished the restriction of both N-MLV and HIV-1. Dual knockdown experiments showed that MDM2 was involved in the restriction mediated by TRIM5 α . Moreover, MDM2 knockdown decreased the sensitivity of N-MLV infection to treatment with MG132 and As₂O₃, two known TRIM5 α pharmacological inhibitors. Altogether, our data suggest that MDM2 is a general but nonessential modulator of TRIM5 α -mediated antiretroviral functions.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Proteins of the TRIM5 family include TRIM5 α , expressed in most primates (Johnson and Sawyer, 2009; Sawyer et al., 2005; Song et al., 2005a,b), the TRIM5–cyclophilin A fusion TRIMCyp expressed in some New World monkeys (Nisole et al., 2004; Sayah et al., 2004), a different TRIM5–CypA fusion found in some Old World monkeys (Brennan et al., 2008; Newman et al., 2008; Virgen et al., 2008; Wilson et al., 2008), as well as related proteins in non-primates (Schaller et al., 2007; Si et al., 2006). All these proteins share the capacity to engage with and inhibit incoming retroviruses at an early post-entry stage (reviewed by Luban, 2007; Nisole et al., 2005; Sodroski, 2004; Strebel et al., 2009; Towers, 2007) through physical interactions with hexameric capsid (CA) proteins forming the viral outer core (Li et al., 2000; Mortuza et al., 2004; Pornillos et al., 2009; Sebastian and Luban,

2005; Stremlau et al., 2006a). The specificity of this interaction determines that of the restriction process, i.e. which retroviruses will be restricted and which will not. TRIM5 α is the most studied member of this family, and determinants in highly variable regions of its C-terminal B30.2/PRYSPRY domain are responsible for the specificity of restriction (Ohkura et al., 2006; Perez-Caballero et al., 2005; Sawyer et al., 2005; Stremlau et al., 2005; Song et al., 2005a). Subtle amino acid differences between TRIM5 α orthologues can typically lead to a profoundly modified restriction range (Li et al., 2006; Stremlau et al., 2005). Reciprocally, subtle differences between retroviral capsid proteins can radically modify their sensitivity to particular TRIM5 α orthologues (Kratovac et al., 2008). For instance, MLV CA amino acid 110 (an arginine in N-tropic strains, a glutamic acid in B-tropic strains) is the main determinant of MLV sensitivity to human TRIM5 α (Hatzioannou et al., 2004; Keckesova et al., 2004; Perron et al., 2004; Towers et al., 2000): N-MLV is inhibited by TRIM5 α _{hu} while B-MLV is not. Other retroviruses, such as the equine infectious anemia virus (EIAV), are also targeted by TRIM5 α _{hu} (Diaz-Griffero et al., 2007; Saenz et al., 2005). Several effector mechanisms underlying the restriction mediated by TRIM5 proteins have been uncovered, including the accelerated decapsidation of retroviral cores (Bérubé et al., 2007; Perron et al., 2007; Stremlau et al., 2006a); an effector function involving the proteasome (Anderson et al., 2006; Diaz-Griffero et al., 2006; Rold and Aiken, 2008; Wu et al., 2006), and a

^{*} Corresponding author. Fax: +1 819 376 5084.

E-mail addresses: marine.malbec@pasteur.fr (M. Malbec), quangtoan.pham@uqtr.ca (Q.T. Pham), melodie.bplourde@uqtr.ca (M.B. Plourde), alexandra.letourneau-hogan@uqtr.ca (A. Létourneau-Hogan), nepveutr@uqtr.ca (M.-É. Nepveu-Traversy), berthoux@uqtr.ca (L. Berthoux).

¹ Present address: Virus and Immunity Group, Department of Virology, Pasteur Institute, Paris, France.

block to nuclear transport (Berthoux et al., 2004; Wu et al., 2006; Ylinen et al., 2005).

The involvement of other cellular proteins in the restriction mediated by TRIM5 α was suspected early after the discovery of its role in antiretroviral defenses. A TE671-derived human cell line that had been selected for the absence of restriction against “N-tropic” strains of the murine leukemia virus (Sayah and Luban, 2004) was later found to express TRIM5 α at normal levels, implying that other factors could modulate TRIM5 α activity (Luban, 2007). Transduction of various primate TRIM5 α cDNAs into cells of species devoid of endogenous TRIM5 α can transfer the restriction activity, but some cell lines (e.g. canine D17) offer an environment much less conducive to restriction than others (e.g. murine MDTF), again arguing for the modulation by unknown cellular factors (Bérubé et al., 2007). Restriction by TRIM5 α is also regulated through its expression levels: transcription from the *trim5* gene is significantly increased by interferons, hence enhancing restriction (Asaoka et al., 2005; Carthagen et al., 2008). Lastly, cyclophilin A (CypA) was found to be important for the TRIM5 α -mediated restriction of HIV-1, whose CA binds CypA (Berthoux et al., 2005; Keckesova et al., 2006; Stremlau et al., 2006b). The mechanism underlying the CypA involvement in restriction has yet to be clarified. It has been proposed (Berthoux et al., 2005; Stremlau et al., 2006b) that CypA may catalyze the isomerization of proline residues within the CA protein CypA-binding loop, thereby modulating its interactions with TRIM5 α . Of note, the importance of CypA in HIV-1 restriction is dependent upon TRIM5 α expression levels: the presence of CypA is critical to HIV-1 restriction by endogenous TRIM5 α in Old World monkey cells (Berthoux et al., 2005), but is largely dispensable when TRIM5 α expression is driven by highly efficient promoters such as the cytomegalovirus immediate-early one (Berthoux et al., 2005; Stremlau et al., 2006b).

In order to discover novel cellular factors implicated in the restriction mediated by TRIM5 α , we have undertaken a loss-of-function approach based on RNA interference. This genetic screen has yielded several candidates that are potentially important for the modulation of the N-MLV restriction by endogenous human TRIM5 α , and MDM2 is the first of these gene products to be validated and characterized.

Results and discussion

A loss-of-function screen to identify N-MLV restriction factors

Challenging mammalian cells with large amounts of a virus can lead to the discovery of factors mediating resistance to this virus, simply by analyzing gene expression in the few uninfected cells. This is, in fact, the gain-of-function strategy that led to the characterization of TRIM5 α as an antiretroviral factor (Stremlau et al., 2004). We reasoned that the reciprocal loss-of-function approach, i.e. challenging cells with a virus that is inhibited in normal conditions and then characterizing gene expression in the few infected cells, could also uncover host factors regulating viral replication. As described in Fig. 1A, we first transduced human TE671 rhabdomyosarcoma cells with a commercially available lentiviral vector-based shRNA expression library. This library contains about 200,000 shRNAs predicted to target 47,800 human mRNAs. Relatively low multiplicities of infection (MOI) were used in order to avoid expression of multiple different shRNAs in individual cells. Untransduced cells were eliminated by antibiotic treatment and surviving cells were pooled and challenged with an N-MLV-based, GFP-expressing retroviral vector. Replication of this vector is strongly inhibited (100-fold or more) by TRIM5 α in many human cell lines including TE671 (Towers et al., 2000). The amount of N-MLV-GFP vector used was adjusted so that about 0.1% of the parental cells would be infected (or about 10% in the absence of TRIM5 α -mediated restriction). GFP-positive cells (hence highly permissive to N-MLV infection) were sorted by flow cytometry and plated individually. Sixty surviving GFP-positive clones were grown

and ultimately split in two wells. Cells in one well were challenged with a single dose of an N-MLV based vector expressing the red fluorescent protein (RFP) while cells in the other well were infected with the B-MLV unrestricted control. The ratio between the percentage of cells infected by B-MLV versus infected by N-MLV vectors is representative of specific N-MLV restriction levels. This step of functional screening allowed us to exclude cell clones in which permissiveness was enhanced not just for N-MLV infection but for B-MLV as well. Among the 60 clones analyzed, 12 showed B-MLV/N-MLV ratios that were more than 5-fold smaller than in the parental cells. shRNA-encoding sequences were amplified from them and sequenced.

In one of the cell lines with reduced N-MLV restriction activity, the shRNA expressed was complementary to the 23-mer RNA sequence CCUAGGAUUUAGACAACCUGAA, which is present in the human MDM2 mRNA. Secondary targets were unlikely, since an NCBI blast search for other possible matches yielded candidates with regions of homology to the bait sequence that were only 15-mer long or less. MDM2 has been characterized for many years as the E3 ubiquitin ligase regulating cellular levels of the tumor suppressor p53 (Brooks and Gu, 2006; Stommel and Wahl, 2005). MDM2 has more recently been involved (through its ubiquitin ligase activity) in the antiretroviral functions mediated by APOBEC3G and countered by lentiviral Vif proteins (Izumi et al., 2009). Because a proteasome-linked effector mechanism has been implicated in TRIM5 α -mediated restriction (Anderson et al., 2006; Wu et al., 2006), we focused on MDM2 among the various other library hits. First, to confirm that the decrease in N-MLV restriction in the cell clone was caused by the MDM2-targeting shRNA, we re-cloned its coding sequence in the parental pSIH1-H1-Puro construct and re-transduced it into TE671 cells. As a control, we used cells that were transduced with the entire shRNA-expressing library. After infection with N-MLV and B-MLV vectors expressing GFP, we found the ratio of B-MLV/N-MLV viral titers to be decreased 3-fold in the cells expressing the MDM2 shRNA, relative to the control cells (Fig. 1B). Compared to the untransduced parental cells, the reduction in restriction was slightly stronger (5-fold), indicating that expression of unspecific shRNAs had a small (less than 2-fold) inhibitory effect on restriction (not shown). A Western blot analysis confirmed that MDM2 steady-state levels were decreased in cells expressing the shRNA isolated from the screen (Fig. 1C). In addition to the main ~80 kDa species, a smaller band was observed that probably resulted from cleavage of the larger one, as previously shown by others (Pochampally et al., 1998). In order to rule out the possibility that off-target mRNAs were responsible for the observed decrease in restriction, we constructed three additional shRNAs expected to target MDM2. The control shRNA targeted the firefly luciferase mRNA (Sayah et al., 2004). Two of the three MDM2 shRNAs reduced MDM2 expression, and shRNA #2 was the most efficient one in that respect (Fig. 1D). None of the shRNAs had a significant effect on B-MLV replication but expression of the MDM2 shRNA #2 increased N-MLV replication (Fig. 1E), confirming that MDM2 knockdown can affect N-MLV restriction. The magnitude of this effect (2-fold) was smaller, however, than what had been observed with the shRNA isolated from the screen. Therefore, subsequent experiments were done using the latter shRNA construct.

MDM2 antiretroviral activity is mediated by TRIM5 α

Theoretically, MDM2 could be involved in an N-MLV restriction mechanism independent of TRIM5 α . For instance, other ubiquitin ligases belonging to the TRIM family, such as TRIM19 (PML), TRIM25 and TRIM26, have been shown to specifically decrease the infectious power of N-MLV vectors (Uchil et al., 2008) and the reported magnitude of these effects was similar to what we observed here. In order to unambiguously determine whether MDM2 was involved in TRIM5-dependent or -independent restriction, we performed dual-

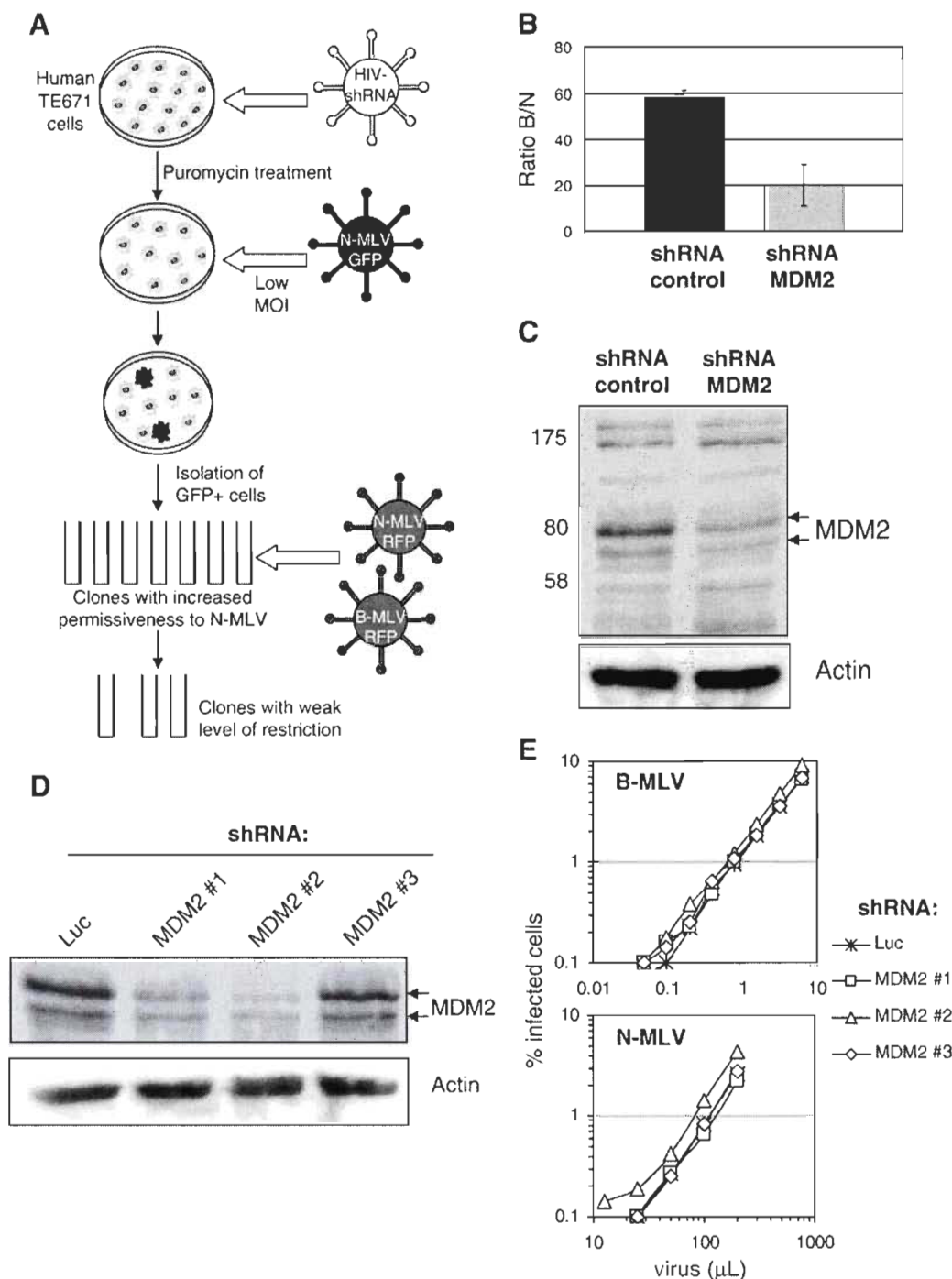


Fig. 1. An RNA interference-based genetic screen to identify cellular factors restricting N-MLV. **A**, schematic overview of the genetic screen. An HIV-1 retroviral vector-based library of 200,000 shRNAs targeting 47,800 human mRNAs was transduced into human TE671 cells. Untransduced cells were killed by puromycin treatment, and surviving cells were infected with a low dose of GFP-expressing N-MLV retroviral particles. GFP-positive cells were grown and the resulting colonies challenged with RFP-expressing N-MLV or B-MLV. Clones with weak N-MLV restriction levels are those in which the B-MLV/N-MLV infectivity ratio is decreased by 5-fold or more relative to the parental (untransduced) cells. **B**, TE671 cells transduced with the MDM2 shRNA recovered from the screen, or transduced with the full library as a control, were challenged with identical amounts of GFP-expressing B-MLV and N-MLV vectors. The dose of virus used was adjusted so that 10–20% of control cells were infected with the B-MLV control. Average B-MLV/N-MLV ratio of % GFP-positive cells from triplicate infections are shown with standard deviations. **C**, lysates were prepared from the control cells or from cells transduced with the MDM2 shRNA, following a 6 h MG132 treatment to stabilize MDM2. MDM2 and actin were detected using monoclonal antibodies. **D**, three additional shRNAs targeting MDM2 were constructed in a different retroviral vector (pAPM). These shRNAs were transduced into TE671 cells along with a control shRNA targeting luciferase. Following the elimination of untransduced cells by puromycin treatment, protein lysates were prepared and MDM2 was detected by Western blotting, along with actin as a loading control. **E**, the same cell lines as in **D** were infected with serially diluted N-MLV or B-MLV vectors expressing GFP. Three days later, percentages of infected (GFP-positive) cells were determined by flow cytometry.

shRNA experiment, an approach used previously for cyclophilin A (Berthoux et al., 2005). TE671 cells were transduced with constructs encoding either MDM2 shRNA, TRIM5 shRNA or both (Fig. 2A). The cell lines generated were then challenged with the unrestricted

control vector B-MLV_{GFP}, along with two restricted retroviral vectors: N-MLV_{GFP} and EIAV_{GFP}. As expected, none of the shRNA combinations had a significant effect on B-MLV replication, although MDM2 knockdown slightly enhanced its replication (less than 2-fold). N-

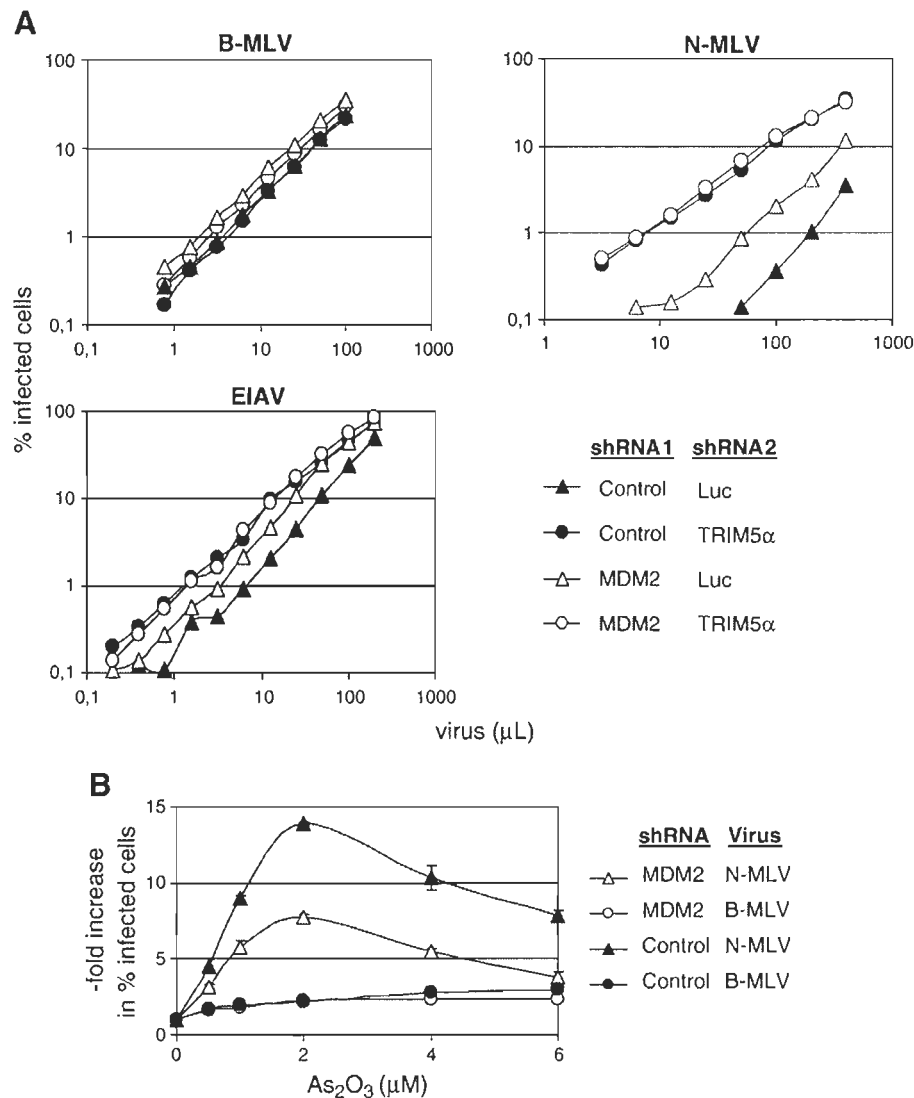


Fig. 2. MDM2 is involved in the TRIM5 α -mediated restriction of N-MLV. **A.** TE671 cells stably expressing the MDM2 shRNA or control cells expressing the whole shRNA library were transduced with pAPM-based retroviral vectors expressing a TRIM5 shRNA or a control shRNA targeting luciferase. Cells were then challenged at multiple MOIs with N-MLV, B-MLV and EIAV vectors expressing GFP. Percentages of GFP-expressing cells were determined 3 days later by flow cytometry. **B.** TE671 cells expressing the MDM2 shRNA along with the control cells were infected with N-MLV or B-MLV at virus doses leading to approximately 1% infected cells in the absence of drug. Infections were performed in the presence of various As_2O_3 concentrations. GFP-expressing cells were counted by flow cytometry 3 days later, and results are expressed as fold increase relative to the controls without drug. Average results from triplicate infections are shown with standard deviations.

MLV replication was increased about 5-fold by MDM2 knockdown and about 50-fold by TRIM5 knockdown (Fig. 2A, top right panel). In the presence of the TRIM5 shRNA, however, co-expression of the MDM2 shRNA had no effect at all on N-MLV replication, showing that MDM2 is involved in a TRIM5-dependent inhibitory mechanism. Similar data were obtained with EIAV, whose replication was increased 2-fold in the presence of the MDM2 shRNA and 4-fold in the presence of either the TRIM5 shRNA alone or a combination of both shRNAs.

MDM2 knockdown decreases N-MLV sensitivity to arsenic trioxide

TRIM5 α -mediated restriction is inhibited by arsenic trioxide (As_2O_3) in a virus strain-independent, TRIM5 orthologue-independent, cell context-dependent fashion (Berthoux et al., 2003; Sebastian et al., 2006). The molecular effects of As_2O_3 on TRIM5 α are presently unknown, although some clues might be gathered from reports that this drug causes the polyubiquitination and degradation of another protein of the TRIM family (Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Tatham et al., 2008). We infected TE671-control and TE671-MDM2

shRNA cells at fixed virus doses adjusted to yield 0.5–2% infected cells in the absence of drug. These infections were performed in presence of various As_2O_3 concentrations, and the increase in percentages of infected cells in presence of the drug was monitored. In control cells, As_2O_3 enhanced the replication of N-MLV by up to 13-fold, while having a much smaller, “background” effect of about 2-fold on B-MLV. In cells expressing the MDM2 shRNA, As_2O_3 -induced enhancement of N-MLV was decreased by 2-fold. This observation confirms that MDM2 acts on MLV inhibition through TRIM5 α -mediated mechanisms.

MDM2 knockdown decreases N-MLV sensitivity to MG132 and enhances viral DNA accumulation

Inhibition of proteasomal functions affects effector mechanisms associated with TRIM5 α -mediated restriction. Specifically, MG132 treatment restores nearly normal levels of viral cDNA accumulation under restrictive conditions; however, the decrease in infectivity caused by restriction is usually not greatly affected, because other TRIM5 α effector mechanisms are maintained in presence of this

drug (Anderson et al., 2006; Wu et al., 2006). Because MDM2, like TRIM5 α , is a ubiquitin ligase, we were especially interested in determining whether its effect on restriction was proteasome-dependent or -independent. Thus, we infected TE671 cells (MDM2 knockdown or control) with equal doses of N-MLV or B-MLV and in the presence or absence of MG132 or azidothymidine (AZT), a reverse transcriptase inhibitor. We then either performed infection assays (Fig. 3A and B) or extracted total cellular DNAs and quantified the amounts of viral DNA synthesized (Fig. 3C and D). As in the previous experiments, N-MLV was more infectious (3- to 4-fold) in cells expressing the MDM2 shRNA compared to the control cells (Fig. 3A). In the control cells, MG132 increased N-MLV replication by about 3-fold. Interestingly, in cells expressing the MDM2 shRNA, MG132 had no significant effect on N-MLV replication (Fig. 3A). Because replication of the B-MLV control was itself slightly increased by either MDM2 knockdown or by MG132 treatment, we plotted our data as ratios of B-MLV/N-MLV infectivity in control cells and in MDM2-knockdown cells and in presence or not of MG132 (Fig. 3B). This analysis clearly shows that (i) MG132 treatment and MDM2 knockdown reduce N-MLV restriction by 2-fold and 3-fold, respectively, and (ii) the effect of MDM2 knockdown is much smaller upon inhibition of the proteasome by MG132. In the presence of the MDM2 shRNA, accumulation of N-MLV DNA was enhanced by about 2-fold (Fig. 3C and D). However, and consistently with data published by others (Anderson et al., 2006), MG132 treatment had a much bigger effect on N-MLV DNA levels, and this effect was largely conserved in MDM2-knockdown cells (see Fig. 3D in particular). Altogether, the data in Fig. 3 show that the involvement of MDM2 in N-MLV restriction is indeed proteasome-dependent, but that additional,

proteasome-dependent mechanisms (most probably, TRIM5 α ubiquitin ligase activity) play a more important role in inhibiting viral DNA accumulation in restrictive conditions.

MDM2 knockdown can also affect retroviral restriction in nonhuman cells

Exploiting the capacity of some African green monkey (AGM) TRIM5 α orthologues to strongly restrict both HIV-1 and N-MLV, we transduced 5 different MDM2-specific shRNAs in Vero cells. In these cells, TRIM5 α decreases the replication of both N-MLV and HIV-1 by more than 10-times, while having little or no effect on B-MLV or SIV_{mac} (Berthoux et al., 2005; Sebastian et al., 2006; Song et al., 2005b; Yap et al., 2004). *Mus dunni* tail fibroblasts, in which these retroviruses are not restricted, were also transduced as controls. Even though the AGM MDM2 coding sequence is not known, the specific sequences targeted were chosen because they were conserved in both human and macaque MDM2 orthologues. We found that two of the shRNAs, #2 and #5, efficiently reduced MDM2 expression in Vero cells and both were also found to knock down MDM2 in the murine cells (Fig. 4, left panels). In order to accurately quantify the specific effect of each of the shRNAs on the restriction of HIV-1 and N-MLV in Vero cells, we opted to use a single virus dose for each virus tested (HIV-1_{GFP}, SIV_{mac-GFP}, N-MLV_{GFP}, B-MLV_{GFP}) and adjusting it so that about 1% of the cells are infected in the control cells expressing the luciferase-specific shRNA (Fig. 4, right panels). In order to rule out possible nonspecific effects of the shRNAs on the general permissiveness to retroviral infections, we monitored the N-MLV/B-MLV and HIV-1/SIV_{mac} infectivity ratios. The results show that the relative infectivity

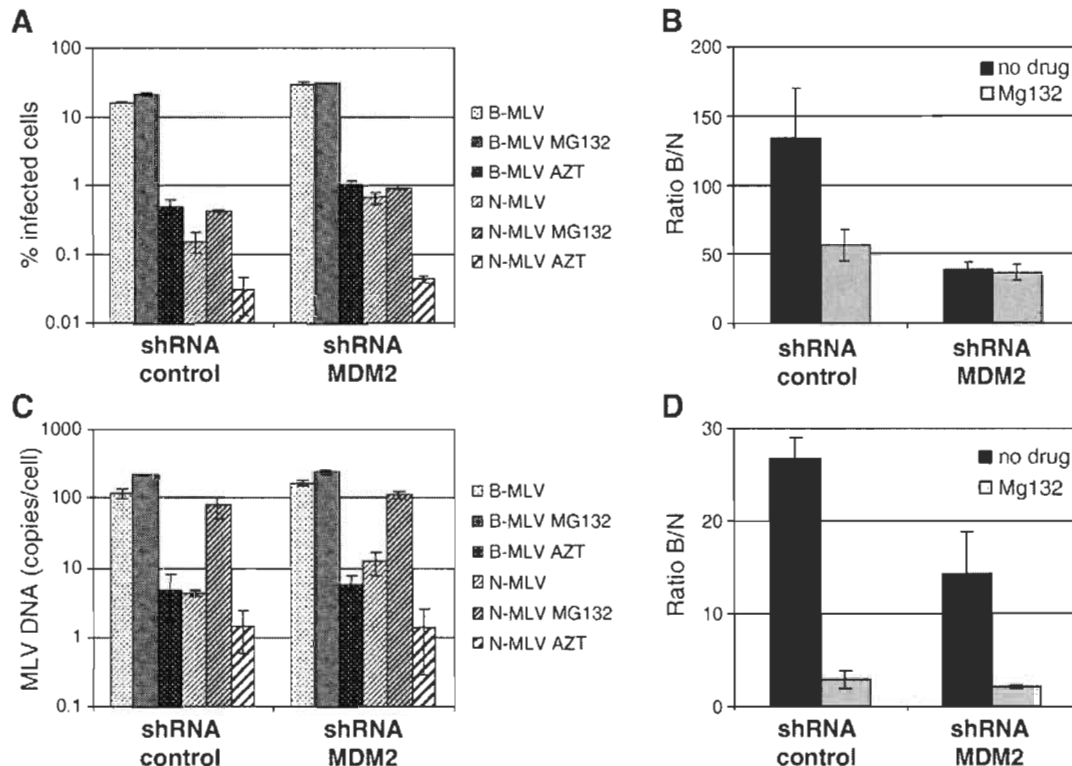


Fig. 3. MDM2-mediated restriction of N-MLV is proteasome-sensitive and decreases viral DNA levels. A, TE671 cells expressing the MDM2 shRNA and control cells were infected with identical amounts of N-MLV or B-MLV retroviral vectors expressing GFP and in the presence or absence of MG132 or AZT. Three days later, cells were analyzed by flow cytometry for GFP expression. Average percentages of GFP-expressing cells from 3 different infections are shown with standard deviations. B, data from (A) were plotted as ratios of cells infected with B-MLV over cells infected with N-MLV in the various experimental conditions indicated. C, the infection was performed as in (A) but total cellular DNAs were extracted after 12 h. Viral DNA was quantified by real-time PCR using oligonucleotides specific for the GFP coding sequence. Average results from triplicate infections are shown with standard deviations. D, data from (C) were plotted as the ratios of viral DNA in cells infected with B-MLV versus N-MLV.

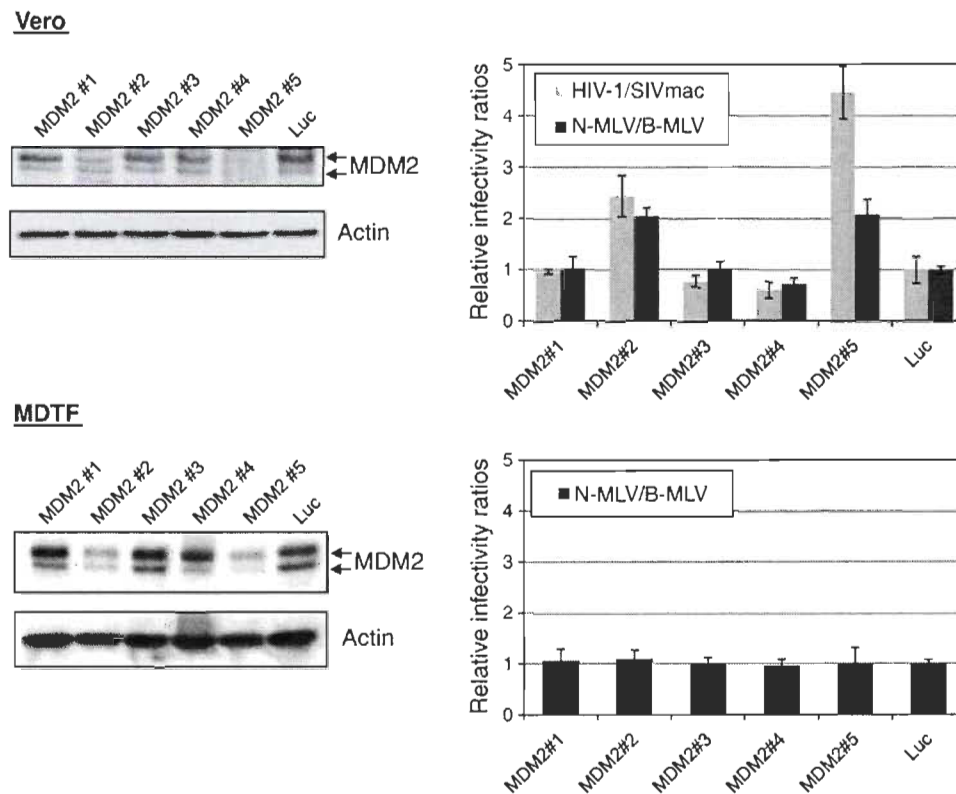


Fig. 4. MDM2 modulates restriction of HIV-1 and N-MLV in an AGM cell line. Vero cells and murine MDTF cells were transduced with 5 different shRNAs specific for MDM2, along with a control shRNA targeting the control gene luciferase. The left panels show a Western blotting analysis of MDM2 expression in the cell lines obtained, with actin serving as a loading control. Right panels: Cells were infected with GFP-encoding retroviral vectors derived from N-MLV, B-MLV, HIV-1 or SIV_{mac}, using a viral dose leading to about 1% infected cells for the control cells expressing an shRNA against luciferase. N-MLV/B-MLV and HIV-1/SIV_{mac} infectivity ratios, representing the specific permissiveness toward N-MLV and HIV-1 infection, were calculated and are plotted as fold difference relative to the control cells. The averages of 4 infections are shown with standard deviations.

of N-MLV was increased by about 2-fold in cells expressing the MDM2 shRNAs #2 and #5, which were the most efficient at reducing MDM2 expression. The relative infectivity of HIV-1 was increased 2- and 4-fold, respectively, in the same cell lines. No effect was seen in the cell lines in which MDM2 expression was not affected. In addition, even though MDM2 was knocked down in MDTF cells about as efficiently as it was in Vero cells, no effect on N-MLV replication could be seen, consistent with the lack of TRIM5-mediated restriction in these cells (Fig. 4, bottom panels). Thus, MDM2 modulation of TRIM5 restrictions is not specific to TE671 cells and is relevant to HIV-1 restriction in addition to N-MLV and EIAV.

MDM2 is dispensable for TRIM5-mediated retroviral restrictions

Reasoning that incomplete MDM2 knockdowns could underestimate the importance of MDM2 in retroviral restrictions, we sought to study TRIM5 antiretroviral activity in conditions of total MDM2 depletion. We transduced TRIM5 α (human and Rhesus macaque) as well as TRIMCyp (Owl monkey) in chicken DT40 B lymphocytes that had been made knock-out for MDM2 (MacDuff et al., 2006) or in the control parental cells (Fig. 5A). TRIM5 α _{hu} seemed to be expressed at levels lower than TRIM5 α _{rh} or TRIMCyp, an observation consistent with our previous findings (Bérubé et al., 2007; Pham et al., 2010; Sebastian et al., 2006). We then analyzed the permissiveness of the cell lines generated toward infection by N-MLV and HIV-1 (Fig. 5B). In the parental cells, N-MLV was inhibited 10-times by TRIM5 α _{hu} and not at all by TRIM5 α _{rh}. This level of restriction is significantly smaller than what is typically found in human or murine fibroblasts, in which N-MLV is restricted about 100-fold by TRIM5 α _{hu} and 10-fold by TRIM5 α _{rh} (Bérubé et al., 2007; Pham et al., 2010). Similarly, HIV-1

was restricted about 10-fold by TRIM5 α _{rh} and TRIMCyp, while expression of these cDNAs yield to a ~100-fold decrease in HIV-1 infectivity in many other cell lines (Bérubé et al., 2007; Pham et al., 2010). N-MLV and HIV-1 infectivity in the MDM2 knockout cells were remarkably similar to that in the control cells. Thus, MDM2 does not modulate TRIM5-mediated restriction in DT40 cells, but a caveat in this experiment is the particular restriction profiles in these cells. Another difference with the previous experiments was that TRIM5 α and TRIMCyp were over-expressed, thus raising the possibility that MDM2 was relevant to retroviral restrictions only when TRIM5 α was expressed at endogenous levels. To test this possibility directly, we transduced human TE671 cells, made knocked-down for MDM2 or not, with TRIM5 α _{hu} or with the control empty vector (Fig. 5C). We then challenged the four cell lines created with N-MLV and B-MLV retroviral vectors. As expected, N-MLV replication was inhibited 100-fold compared with the nonrestricted B-MLV control. Like before, N-MLV (but not B-MLV) infectivity was increased 3-times by expression of the MDM2 shRNA (left panel) but this effect was abrogated when TRIM5 α _{hu} was over-expressed (right panel). Thus, MDM2 modulates TRIM5 α -mediated restriction only when the latter is expressed at low, endogenous levels.

MDM2 modulates TRIM5-mediated retroviral restrictions

Our data show that MDM2 knockdown decreases the restriction of three different retroviruses by two different orthologues of TRIM5 α . The effects seen in our experiments are significant but relatively modest, although this could be partly due to incomplete knockdown of MDM2 expression. On the other hand, experiments using MDM2-knockout chicken DT40 cells transduced with human or simian

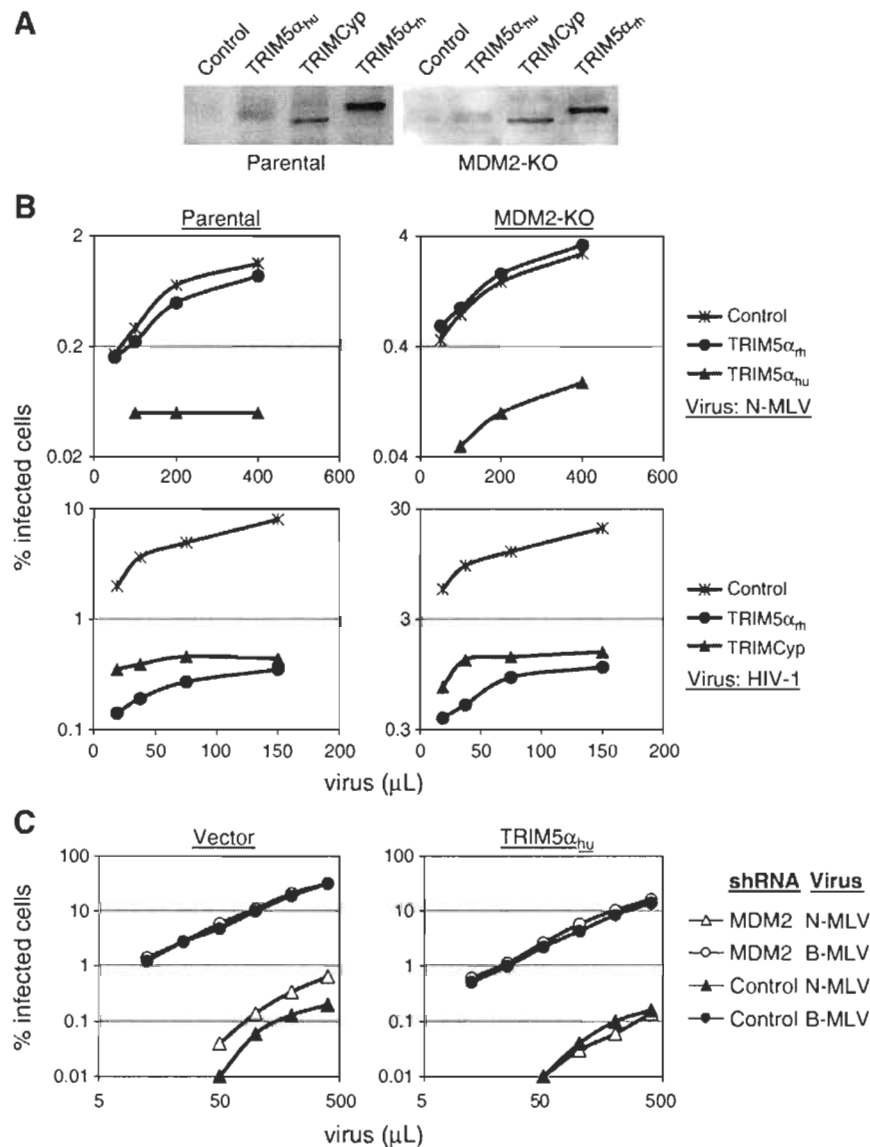


Fig. 5. MDM2 is not essential to TRIM5-mediated restrictions. **A**, chicken DT40 cells were transduced with TRIM5 α (Rhesus or human) or with TRIMCyp (Owl monkey) using pMIH-based retroviral vectors. Control cells were transduced with the “empty” vector. Hygromycin-selected cells were lysed and equal amounts of lysates were analyzed by Western blotting using a FLAG antibody. **B**, the cell lines generated as described above were challenged with several dilutions of GFP-expressing vectors derived from N-MLV or HIV-1. **C**, TE671 cells previously transduced with the shRNAs against MDM2 or the entire library as a control (see Fig. 1) were transduced with a pMIH-based retroviral vector expressing TRIM5 α_{hu} or with the empty vector as a control. Following hygromycin selection, cells were challenged with several dilutions of GFP-expressing N-MLV or B-MLV retroviral vectors and the percentages of infected cells were determined as before.

TRIM5 α cDNAs showed that MDM2 was dispensable for the restriction, although the magnitude of the restriction itself was smaller in these cells than in human or murine cells. In addition, MDM2 knockdown did not affect TRIM5 α -mediated restriction in human or murine cells over-expressing TRIM5 α (Fig. 5 and data not shown). Therefore, the modulation of TRIM5 α activity by MDM2 is dependent upon TRIM5 α expression level, a situation reminiscent of previous observations on the importance of CypA in HIV-1 restriction by some nonhuman primate orthologues of TRIM5 α (Berthou et al., 2005; Stremlau et al., 2006b). Based on this observation, one might speculate that MDM2 simply regulates transcription from the *trim5* gene, but levels of TRIM5 mRNA were similar in MDM2 knockdown versus control cells (not shown). Thus, our data point to the implication of MDM2, probably through its ubiquitin ligase activity, in TRIM5 α restriction effector mechanisms when the latter protein is expressed at endogenous levels. Whether MDM2 knockdown interferes with TRIM5 α stability or function is presently unclear. We find that ubiquitination of over-expressed TRIM5 α is not affected by co-

transfection with either wild-type or mutant MDM2 (not shown), but this experiment could not be done with the endogenous TRIM5 α due to low expression levels. Together with the recently reported implication of MDM2 in APOBEC3G-related restriction, however, our data point to MDM2 as having a previously unsuspected role in cellular innate antiviral defenses.

Materials and methods

Plasmid DNAs

pSIH1-H1-Puro “Genenet™ Human 50 K,” the shRNA-expressing library in plasmid form, was purchased from Systems BioSciences (Mountain View, CA). pMD-G, p Δ R8.9, pTRIP-CMV-GFP, pSIVmac239-Nef-GFP, pCL-Eco, pCIG3N, pCIG3B, pCNCG, pONY3.1 and pONY8.0 all have been extensively described before (Berthou et al., 2004, 2005, 2003; Besnier et al., 2003; Mitrophanous et al., 1999; Naviaux et al., 1996; Zufferey et al., 1997). pMIH is modified version of pMIG (Van

Parijs et al., 1999) that encodes the hygromycin resistance gene instead of GFP. pMIH-TRIM5 α and pMIH-TRIMCyp were constructed by transferring the TRIM5 coding sequences from pMIP-based constructs (Sebastian et al., 2006). For this, the pMIP constructs were cut with EcoR1, blunt-ended with the Klenow polymerase, then cut with Xho1. This DNA fragment was ligated to pMIH cut with Xho1 and Hpa1. pAPM (a kind gift from Jeremy Luban) is an HIV-1-derived retroviral vector allowing the co-expression of miR30-based shRNAs along with that of the gene of resistance to puromycin. pAPM-TRIM5 α and pAPM-Luc (also provided by J. Luban) express shRNAs targeting the mRNAs of TRIM5 α and luciferase, respectively. pAPM-MDM2 #1 to #5 were constructed by PCR-cloning of the following shRNA-encoding oligonucleotides in pAPM cut with EcoR1 and Xho1: #1, 5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGAATTTAGACAACCTGAAATTAGTGAAGCCACAGATGTAATTCAGGTTGTCTAAATTCCTTGCCTACTGCCTCGGA; #2, 5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCTGTCTATAAGAGAATTATATAGTGAAGCCA CAGATGTATATAATTTCTTATAGACAGGTTGCCTACTGCCTCGGA; #3, 5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGAGCTGCCAAGCTTCTCTGTGAATAGTGAAGCCA CAGATGTATTCACAGAGAAGCTTGGCAGCTGCCTACTGCCTCGGA; #4, 5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCGCAATTAGTGAGACAGAAGAATAGTGAAGC CACAGATGTATTTCTTCTGTCTACTAATTGCTTGCCTACTGCCTCGGA; #5, 5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGCCAGTATATTATGACTAAATAGTGAAGCCA CAGATGTATTTAGTCATAATATACTGGCCATGCCTACTGCCTCGGA. The oligonucleotides used to amplify these sequences were miR30-5'-Xho1, 5'-aaggctcgagaaggtatatTGCTGTTGACAGTGAG; and miR30-3'-EcoR1, 5'-agcccttgatTCCGAGGCACTAGGCA (the regions in capital letters are complementary to the template sequences). pCNCr, an MLV-based vector which expresses the red fluorescent protein (RFP), was constructed by ligating the Not1-Age1 fragment of pCLNCX-Fv1b (Passerini et al., 2006) to pCNCr cut with the same enzymes.

Cells and pharmacological reagents

Human embryonic kidney 293 T cells, human rhabdomyosarcoma TE671 cells and *Mus dunni* tail fibroblasts (MDTF) were all grown in DMEM medium supplemented with 10% foetal bovine serum and antibiotics. DT40 chicken cells (wild-type and MDM2 knockout) were a generous gift from Reuben S. Harris (MacDuff et al., 2006). Stocks of the proteasome inhibitor MG132 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) and of the reverse transcriptase inhibitor AZT (Sigma-Aldrich) were prepared in DMSO and PBS buffer, respectively, and kept at -20°C until use.

Virus production

All viruses used in this study were produced by transient transfection of 293 T cells using polyethylenimine. For that, a mixture of the appropriate DNAs diluted in 1 ml of DMEM without serum or antibiotics was mixed with 45 μl of a 1 mg/ml solution of polyethylenimine (Polysciences, Warrington, PA). This transfection mix was then added to 70% confluent 293 T cells in 10-cm tissue culture dishes. The next day, cells were PBS-washed once and put back in culture in fresh medium. Two days after transfection, virus-containing supernatants were collected, clarified by low-speed centrifugation and stored in 1-ml aliquots at -80°C .

To produce the SIH1-H1-Puro lentiviral vector preparation, the transfection mix included 10 μg of pAR8.9, 5 μg of pMD-G, and 10 μg of pSIH1-H1-Puro-shRNA. To produce the N-MLV_{GFP}, B-MLV_{GFP}, N-MLV_{RFP} and B-MLV_{RFP} vectors, 10 μg of pCIG3 N or B, 5 μg of pMD-G, and 10 μg of pCNCr or pCNCr were used. EIAV_{GFP} was produced by co-transfecting 10 μg each of pONY3.1 and pONY8.0 and 5 μg of pMD-G. HIV-1_{GFP} was produced by co-transfecting 10 μg each of pTRIP-CMV-GFP and pAR8.9 and 5 μg of pMD-G, while SIV_{mac-GFP} was produced by co-transfecting pSIVmac239_{Nef-GFP} (10 μg) and pMD-G (5 μg). For the APM-based miR30/shRNA-encoding retroviral vectors, the transfection mix included 5 μg of pMD-G, 10 μg of pAR8.9 and 15 μg of the appropriate pAPM plasmid. To produce the MIH-based

vectors, the mix included 5 μg of pMD-G, 10 μg of pCL-Eco and 10 μg of the appropriate pMIH plasmid.

Transductions

To transduce the SIH1-H1-Puro library, the amount of vector used was adjusted so that 10–20% of the cells would be transduced, based on puromycin resistance. Four 10-cm petri dishes, each containing 1×10^6 TE671 cells, were infected with 0.5 ml of the SIH1-H1-Puro library. Two days later, cells were placed in medium containing 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin (Sigma). Puromycin selection was allowed to proceed for 5 days, and then again periodically during the course of this work. Successfully transduced cells were pooled prior to functional screening. To transduce individual shRNAs (pSIH1-H1-Puro-based or pAPM-based), TE671 cells were plated at 125,000 cells per well in 6-well plates. The next day, supernatants were aspirated and replaced with the undiluted vector preparation (2 ml per well). Untransduced cells were eliminated by antibiotic treatment as described above. TE671 and DT40 cells were transduced with MIH-based retroviral vectors in 6-well plates as above. Untransduced cells were killed by treatment with 1 mg/ml (DT40) or 0.8 mg/ml (TE671) of hygromycin.

Viral challenges

Cells were plated at 25,000 cells in 0.4 ml per well of 24-well plates. The next day, they were infected with the GFP-expressing vectors. Cell supernatants were replaced with fresh medium the day after infection. When MG132 or As₂O₃ was used, they were added about 15 min prior to infection and cells were treated for 14 h. Whenever normalization of N-MLV/B-MLV virus doses was needed, it was done according to viral titers as determined on nonrestrictive MDTF cells. Two to 3 days post infection, cells were trypsinized and fixed in 2% formaldehyde-PBS. Flow cytometry was done on a FC500 MPL instrument (Beckman Coulter) using the CXP software for analysis. Intact cells were identified based on light scatter profiles, and only those cells were included in the analysis. Cells (10,000 per sample) were processed, and cells positive for GFP expression were gated and counted as a percentage of total intact cells. Cells expressing GFP and RFP were first gated for GFP expression and infected cells were computed as % of cells expressing both RFP and GFP among all GFP-positive cells.

PCR and sequencing of shRNA-encoding sequences

To amplify integrated, SIH1-H1-Puro-encoded shRNAs, 120 ng of genomic DNA prepared with the DNEasy kit (Qiagen, Mississauga, ON) were submitted to 35 cycles of PCR in a 50 μl reaction mix that included Phusion polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) and the manufacturer-provided GC buffer for difficult templates. We used an annealing temperature of 58°C and the following oligonucleotides: pSIH1_3435: 5'-CTCAGACGAGTCCGATCTCC and pSIH1_Rev_GNH: 5'-TCCAGGCTCAGATCTGGTCTA. PCR products were digested with EcoR1 and Kpn1 (New England Biolabs) and re-cloned in pSIH1-H1-Puro cut with the same enzymes. After transformation into *E. coli* DH5 α , plasmid DNAs were extracted from 2-ml cultures by using the Qiagen Miniprep kit and sequenced using the primer pSIH1_3435.

Retroviral DNA quantitative analysis

TE671 cells (200,000) were plated in 2 ml per well in 6-well plates. The next day, they were pre-treated or not prior to the infection with 30 μM of AZT for 2 h or with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of MG132 for 30 min. Viruses used in these analyses were treated with DNase I (20 U/ml; Sigma) for 30 min at room temperature just prior to infections. After 6 h of

infection, supernatants were changed for fresh medium and cells were kept in culture for another 6 h before being harvested. Total cellular DNAs were extracted using the DNeasy kit (Qiagen) and digested for 2 h at 37° C with Dpn1 (New England Biolabs) to further reduce contamination of the samples with plasmid DNA.

For real-time PCR analysis, 2 µl of each DNA preparation were subjected to a 45-cycle PCR in 20 µl total volume containing 10 µl of QuantiTect SYBR Green PCR master mix (Qiagen). The primers used were GFPs, 5'-GACGACGGCACTACAAGAC; GFPas, 5'-TCGTCCATGCC GAGAGTGAT; hGAPDHs, 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT; and hGAPD Has, 5'-TGAGCTTGACAAAGTGGTCG. Dilutions of genomic DNA and of proviral plasmid pCNCG were used to generate standard curves for quantification of GAPDH- and N-MLV-specific cDNAs, respectively. Analyses were performed using the second-derivative-maximum method as part of the LightCycler quantification software.

Western blotting

Cells were treated with 1 µg/ml of MG132 for 6 h just before lysis in an SDS-containing buffer. Protein lysates were resolved by SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and probed with an anti-MDM2 mouse monoclonal antibody (SM334; Santa Cruz Biotechnology, CA) or an anti-actin mouse monoclonal antibody (Santa Cruz) and revealed using an anti-mouse peroxidase-conjugated goat antibody (Santa Cruz).

Acknowledgments

We thank Jeremy Luban (University of Geneva) for the gift of pAPM constructs and Reuben S. Harris (University of Minnesota) for the gift of DT40 cells. This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research, the Canada Research Chairs program and the Fonds de Recherches en Santé du Québec.

References

- Anderson, J.L., Campbell, E.M., Wu, X., Vandegraaff, N., Engelman, A., Hope, T.J., 2006. Proteasome inhibition reveals that a functional preintegration complex intermediate can be generated during restriction by diverse TRIM5 proteins. *J. Virol.* 80 (19), 9754–9760.
- Asaoka, K., Ikeda, K., Hishinuma, T., Horie-Inoue, K., Takeda, S., Inoue, S., 2005. A retrovirus restriction factor TRIM5alpha is transcriptionally regulated by interferons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (4), 1950–1956.
- Berthou, L., Sebastian, S., Sokolskaja, E., Luban, J., 2004. Lvl1 inhibition of human immunodeficiency virus type 1 is counteracted by factors that stimulate synthesis or nuclear translocation of viral cDNA. *J. Virol.* 78 (21), 11739–11750.
- Berthou, L., Sebastian, S., Sokolskaja, E., Luban, J., 2005. Cyclophilin A is required for TRIM5(alpha)-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (41), 14849–14853.
- Berthou, L., Towers, G.J., Curer, C., Salomoni, P., Pandolfi, P.P., Luban, J., 2003. As(2)O (3) enhances retroviral reverse transcription and counteracts Ref1 antiviral activity. *J. Virol.* 77 (5), 3167–3180.
- Bérubé, J., Bouchard, A., Berthou, L., 2007. Both TRIM5alpha and TRIMCyp have only weak antiviral activity in canine D17 cells. *Retrovirology* 4, 68.
- Besnier, C., Ylinen, L., Strange, B., Lister, A., Takeuchi, Y., Goff, S.P., Towers, G.J., 2003. Characterization of murine leukemia virus restriction in mammals. *J. Virol.* 77 (24), 13403–13406.
- Brennan, G., Kozyrev, Y., Hu, S.L., 2008. TRIMCyp expression in Old World primates *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (9), 3569–3574.
- Brooks, C.L., Gu, W., 2006. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol. Cell* 21 (3), 307–315.
- Carthagen, L., Parise, M.C., Ringard, M., Chelbi-Alix, M.K., Hazan, U., Nisole, S., 2008. Implication of TRIM alpha and TRIMCyp in interferon-induced anti-retroviral restriction activities. *Retrovirology* 5, 59.
- Diaz-Griffero, F., Kar, A., Lee, M., Stremlau, M., Poeschla, E., Sodroski, J., 2007. Comparative requirements for the restriction of retrovirus infection by TRIM5alpha and TRIMCyp. *Virology* 369 (2), 400–410.
- Diaz-Griffero, F., Li, X., Javanbakht, H., Song, B., Welikala, S., Stremlau, M., Sodroski, J., 2006. Rapid turnover and polyubiquitination of the retroviral restriction factor TRIM5. *Virology* 349 (2), 300–315.
- Hatzioannou, T., Perez-Caballero, D., Yang, A., Cowan, S., Bieniasz, P.D., 2004. Retrovirus resistance factors Ref1 and Lvl1 are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (29), 10774–10779.
- Izumi, T., Takaori-Kondo, A., Shirakawa, K., Higashitsuji, H., Itoh, K., Ito, K., Matsui, M., Iwai, K., Kondoh, H., Sato, T., Tomonaga, M., Ikeda, S., Akari, H., Koyanagi, Y., Fujita, J., Uchiyama, T., 2009. MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 6, 1.
- Johnson, W.E., Sawyer, S.L., 2009. Molecular evolution of the antiretroviral TRIM5 gene. *Immunogenetics* 61 (3), 163–176.
- Keckesova, Z., Ylinen, L.M., Towers, G.J., 2004. The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lvl1 retroviral restriction factor activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (29), 10780–10785.
- Keckesova, Z., Ylinen, L.M., Towers, G.J., 2006. Cyclophilin A renders human immunodeficiency virus type 1 sensitive to Old World monkey but not human TRIM5 alpha antiviral activity. *J. Virol.* 80 (10), 4683–4690.
- Kratovac, Z., Virgen, C.A., Bibollet-Ruche, F., Hahn, B.H., Bieniasz, P.D., Hatziioannou, T., 2008. Primate lentivirus capsid sensitivity to TRIM5 proteins. *J. Virol.* 82 (13), 6772–6777.
- Lallemant-Breitbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., de The, H., 2008. Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat. Cell Biol.* 10 (5), 547–555.
- Li, S., Hill, C.P., Sundquist, W.I., Finch, J.T., 2000. Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature* 407 (6802), 409–413.
- Li, Y., Li, X., Stremlau, M., Lee, M., Sodroski, J., 2006. Removal of arginine 332 allows human TRIM5alpha to bind human immunodeficiency virus capsids and to restrict infection. *J. Virol.* 80 (14), 6738–6744.
- Luban, J., 2007. Cyclophilin A, TRIM5, and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 81 (3), 1054–1061.
- MacDuff, D.A., Neuberger, M.S., Harris, R.S., 2006. MDM2 can interact with the C-terminus of AID but it is inessential for antibody diversification in DT40 B cells. *Mol. Immunol.* 43 (8), 1099–1108.
- Mitrophanous, K., Yoon, S., Rohll, J., Patil, D., Wilkes, F., Kim, V., Kingsman, S., Kingsman, A., Mazarakis, N., 1999. Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther.* 6 (11), 1808–1818.
- Mortuza, G.B., Haire, L.F., Stevens, A., Smerdon, S.J., Stoye, J.P., Taylor, I.A., 2004. High-resolution structure of a retroviral capsid hexameric amino-terminal domain. *Nature* 431 (7007), 481–485.
- Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M., Verma, I.M., 1996. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J. Virol.* 70 (8), 5701–5705.
- Newman, R.M., Hall, L., Kirmaier, A., Pozzi, L.A., Pery, E., Farzan, M., O'Neil, S.P., Johnson, W., 2008. Evolution of a TRIM5–CypA splice isoform in old world monkeys. *PLoS Pathog.* 4 (2), e1000003.
- Nisole, S., Lynch, C., Stoye, J.P., Yap, M.W., 2004. A Trim5–cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (36), 13324–13328.
- Nisole, S., Stoye, J.P., Saib, A., 2005. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (10), 799–808.
- Ohkura, S., Yap, M.W., Sheldon, T., Stoye, J.P., 2006. All three variable regions of the TRIM5alpha B30.2 domain can contribute to the specificity of retrovirus restriction. *J. Virol.* 80 (17), 8554–8565.
- Passerini, L.D., Keckesova, Z., Towers, G.J., 2006. Retroviral restriction factors Fv1 and TRIM5alpha act independently and can compete for incoming virus before reverse transcription. *J. Virol.* 80 (5), 2100–2105.
- Perez-Caballero, D., Hatziioannou, T., Yang, A., Cowan, S., Bieniasz, P.D., 2005. Human tripartite motif 5alpha domains responsible for retrovirus restriction activity and specificity. *J. Virol.* 79 (14), 8969–8978.
- Perron, M.J., Stremlau, M., Lee, M., Javanbakht, H., Song, B., Sodroski, J., 2007. The human TRIM5alpha restriction factor mediates accelerated uncoating of the N-tropic murine leukemia virus capsid. *J. Virol.* 81 (5), 2138–2148.
- Perron, M.J., Stremlau, M., Song, B., Ulm, W., Mulligan, R.C., Sodroski, J., 2004. TRIM5alpha mediates the postentry block to N-tropic murine leukemia viruses in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (32), 11827–11832.
- Pham, Q.T., Bouchard, A., Grutter, M.G., Berthou, L., 2010. Generation of human TRIM5alpha mutants with high HIV-1 restriction activity. *Gene Ther.*
- Pochampally, R., Fodera, B., Chen, L., Shao, W., Levine, E.A., Chen, J., 1998. A 60 kd MDM2 isoform is produced by caspase cleavage in non-apoptotic tumor cells. *Oncogene* 17 (20), 2629–2636.
- Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B.K., Kelly, B.N., Hua, Y., Whitby, F.C., Stout, C.D., Sundquist, W.I., Hill, C.P., Yeager, M., 2009. X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell* 137 (7), 1282–1292.
- Rold, C.J., Aiken, C., 2008. Proteasomal degradation of TRIM5alpha during retrovirus restriction. *PLoS Pathog.* 4 (5), e1000074.
- Saenz, D.T., Teo, W., Olsen, J.C., Poeschla, E.M., 2005. Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lvl1, and primate TRIM5alpha proteins. *J. Virol.* 79 (24), 15175–15188.
- Sawyer, S.L., Wu, L.L., Emerman, M., Malik, H.S., 2005. Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (8), 2832–2837.
- Sayah, D.M., Luban, J., 2004. Selection for loss of Ref1 activity in human cells releases human immunodeficiency virus type 1 from cyclophilin A dependence during infection. *J. Virol.* 78 (21), 12066–12070.
- Sayah, D.M., Sokolskaja, E., Berthou, L., Luban, J., 2004. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* 430 (6999), 569–573.
- Schaller, T., Hue, S., Towers, G.J., 2007. An active TRIM5 protein in rabbits indicates a common antiviral ancestor for mammalian TRIM5 proteins. *J. Virol.* 81 (21), 11713–11721.
- Sebastian, S., Luban, J., 2005. TRIM5alpha selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid. *Retrovirology* 2, 40.

- Sebastian, S., Sokolskaja, E., Luban, J., 2006. Arsenic counteracts human immunodeficiency virus type 1 restriction by various TRIM5 orthologues in a cell type-dependent manner. *J. Virol.* 80 (4), 2051–2054.
- Si, Z., Vandegraaff, N., O'Huigin, C., Song, B., Yuan, W., Xu, C., Perron, M., Li, X., Marasco, W.A., Engelman, A., Dean, M., Sodroski, J., 2006. Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (19), 7454–7459.
- Sodroski, J.G., 2004. Innate intracellular immunity to retroviruses. *Harvey Lect.* 100, 143–153.
- Song, B., Gold, B., O'Huigin, C., Javanbakht, H., Li, X., Stremlau, M., Winkler, C., Dean, M., Sodroski, J., 2005a. The B30.2 (SPRY) domain of the retroviral restriction factor TRIM5alpha exhibits lineage-specific length and sequence variation in primates. *J. Virol.* 79 (10), 6111–6121.
- Song, B., Javanbakht, H., Perron, M., Park, D.H., Stremlau, M., Sodroski, J., 2005b. Retrovirus restriction by TRIM5alpha variants from Old World and New World primates. *J. Virol.* 79 (7), 3930–3937.
- Stommel, J.M., Wahl, G.M., 2005. A new twist in the feedback loop: stress-activated MDM2 destabilization is required for p53 activation. *Cell Cycle* 4 (3), 411–417.
- Strebel, K., Luban, J., Jeang, K.T., 2009. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med.* 7, 48.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., Sodroski, J., 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427 (6977), 848–853.
- Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D.J., Sundquist, W.I., Sodroski, J., 2006a. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (14), 5514–5519.
- Stremlau, M., Perron, M., Welikala, S., Sodroski, J., 2005. Species-specific variation in the B30.2 (SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction. *J. Virol.* 79 (5), 3139–3145.
- Stremlau, M., Song, B., Javanbakht, H., Perron, M., Sodroski, J., 2006b. Cyclophilin A: an auxiliary but not necessary cofactor for TRIM5alpha restriction of HIV-1. *Virology* 351 (1), 112–120.
- Tatham, M.H., Geoffroy, M.C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., Palvimo, J.J., Hay, R.T., 2008. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat. Cell Biol.* 10 (5), 538–546.
- Towers, G., Bock, M., Martin, S., Takeuchi, Y., Stoye, J.P., Danos, O., 2000. A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (22), 12295–12299.
- Towers, G.J., 2007. The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology* 4, 40.
- Uchil, P.D., Quinlan, B.D., Chan, W.T., Luna, J.M., Mothes, W., 2008. TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle. *PLoS Pathog.* 4 (2), e16.
- Van Parijs, L., Refaeli, Y., Lord, J.D., Nelson, B.H., Abbas, A.K., Baltimore, D., 1999. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity* 11 (3), 281–288.
- Virgen, C.A., Kratovac, Z., Bieniasz, P.D., Hatzioannou, T., 2008. Independent genesis of chimeric TRIM5–cyclophilin proteins in two primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (9), 3563–3568.
- Wilson, S.J., Webb, B.L., Ylinen, L.M., Verschoor, E., Heeney, J.L., Towers, G.J., 2008. Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (9), 3557–3562.
- Wu, X., Anderson, J.L., Campbell, E.M., Joseph, A.M., Hope, T.J., 2006. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (19), 7465–7470.
- Yap, M.W., Nisole, S., Lynch, C., Stoye, J.P., 2004. Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (29), 10786–10791.
- Ylinen, L.M., Kekesova, Z., Wilson, S.J., Ranasinghe, S., Towers, G.J., 2005. Differential restriction of human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVmac by TRIM5alpha alleles. *J. Virol.* 79 (18), 11580–11587.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., Trono, D., 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* 15 (9), 871–875.